SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

Q.F.

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 06-32880

54. **TITULO** ADMINISTRACION DE LIGANDOS TLR7 Y SUS PROFARMACOS PARA TRATAMIENTO DE INFECCION POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A61K31/708, A61P31/14

71. **SOLICITANTE** ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO SAN DIEGO CA 92121 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** HECTOR GOMEZ MEJIA

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** _____

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

SJ

PETITORIO

AS: 100.707

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-032880- -00000-0000 Fec: 2006-04-04 16:58:16
Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII Eva 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 362

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL : 05.04.2006

1 **SOLICITUD DE:**

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 **SOLICITANTE (71)**	Nombre: **ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.** Dirección: 3115 Merryfield Row, San Diego, CA 92121, Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número
3 **REPRESENTANTE O APODERADO**	Nombre: HECTOR GOMEZ MEJIA Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número 22720 TP 19436
4 **INVENTOR (ES) (72)**	Nombre: Devron R. Averett Dirección: 2529 Newport Avenue, Cardiff By The Sea, CA 92007, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/028236 Fecha 01-09-2004
Publicación Internacional No. WO 2005/025583 A3 Fecha 24-03-2005

Título (54): ADMINISTRACIÓN DE LIGANDOS TLR7 Y SUS PROFÁRMACOS PARA TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

7 Clasificación Internacional (51) A61K 31/708, A61P 31/14.

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	05-09-2003	60/500,339
US	10-11-2003	60/518,996
US	10-11-2003	60/518,997

9 Comprobante de pago No. 06-11,544 **Fecha** 03-04-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $463.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del *examen preliminar* efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros Tarjeta de Propietarios

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: HECTOR GOMEZ MEJIA

FIRMA:

C.C. 2720 de Bogotá T.P. 1438 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-032880- -00000-0000 Fec: 2006-04-04 16:58:18
Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII Eva 378 FASENACIONALII
Art.411 PRESENTACION Folios: 362

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 11,544
FECHA : FEBRERO 10 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45025821	10/02/2006	36,630,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 March 2005 (24.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/025583 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/708, A61P 31/14

(21) International Application Number:
PCT/US2004/028236

(22) International Filing Date:
1 September 2004 (01.09.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/500,339	5 September 2003 (05.09.2003)	US
60/518,996	10 November 2003 (10.11.2003)	US
60/518,997	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 3115 Merryfield Row, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: AVERETT, Devron, R. [US/US]; 2529 Newport Avenue, Cardiff By The Sea, CA 92007 (US).

(74) Agent: PINO, Mark, J.; Connolly Bove Lodge & Hutz LLP, 1990 M Street, N.W., Suite 800, Washington, DC 20036-3425 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
19 May 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: TLR7 LIGANDS FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C

(57) Abstract: This invention relates to methods for treating or preventing hepatitis C virus infections in mammals using Toll-Like Receptor (TLR)7 ligands and prodrugs thereof. More particularly, this invention relates to methods of orally administering a therapeutically effective amount of one or more prodrugs of TLR7 ligands for the treatment or prevention of hepatitis C viral infection. Oral administration of these TLR7 immunomodulating ligands and prodrugs thereof to a mammal provides therapeutically effective amounts and reduced undesirable side effects.

WO 2005/025583 A3

AS: 100707

ADMINISTRATION OF TLR7 LIGANDS AND PRODRUGS THEREOF FOR TREATMENT OF INFECTION BY HEPATITIS C VIRUS

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/500,339, filed September 5, 2003, U.S. Provisional Application No. 60/518,996, filed November 10, 2003, and U.S. Provisional Application No. 60/518,997, filed November 10, 2003.

1. FIELD OF THE INVENTION

[0002] This invention relates to methods for treating or preventing hepatitis C virus infections in mammals using Toll-Like Receptor (TLR)7 ligands and prodrugs thereof. More particularly, this invention relates to methods of orally administering a therapeutically effective amount of one or more prodrugs of TLR7 ligands for the treatment or prevention of hepatitis C viral infection. Oral administration of these TLR7 immunomodulating ligands and prodrugs thereof to a mammal provides therapeutically effective amounts and reduced undesirable side effects.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Immunomodulation by small molecules can be achieved by identifying compounds that bind and activate Toll-Like Receptors (TLRs). TLRs play an important role in innate immune responses in mammals and are often the first line of defense against pathogens such as bacteria and viruses. The various TLRs vary in their abundance in different mammalian cell types and also vary regarding the molecular structures that bind the TLR and activate signaling pathways. These signaling pathways lead to the range of responses associates with innate immunity.

[0004] TLRs detect PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) and stimulate immune cells via the MyD88-dependent interleukin 1 receptor (IL-1R)-TLR signaling pathway, which leads to activation of the transcription factor NF-κB2. Ten functional family members of TLRs (TLR1 to TLR10) have been identified in humans. Akira S. *et al.*, *Nature Immunol.*, 2, 675-680 (2001). TLR2, TLR4, and TLR5 are crucial for the recognition of peptidoglycan, lipopolysacharide, and flagellin. Hayashi, F. *et al.*, *Nature*, 410, 1099-1103 (2001). TLR6 associates with TLR2 and recognizes lipoproteins from mycoplasma. Ozinsky, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 97, 13766-13771 (2000). TLR9 detects bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs and TLR3 activates immune cells in response to double-stranded RNA. Hemmi, H. *et al.*, Nature, 408, 740-745 (2000).

[0005] A number of compounds, including guanosine analogs, substituted pyrimidines, and imidazoquinolines have been reported as ligands for TLR7. See, e.g., Hemmi *et al.*, *Nature* Immunol., 3, 196-200 (2002) (imiquimod and R-848 (resiquimod));

Jurk *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3, 499 (2002) (R-848); and Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100, 6646-6651 (2003) (wherein guanosine analogs loxoribine, 7-thia-8-oxoguanosine (isatoribine), and 7-deazaguanosine, and the imidazoquinolines imiquimod and R-848 (resiquimod) selectively activate TLR7).

[0006] Prior to being linked as potential TLR7 ligands, guanosine analogs and other D- and L-purine nucleosides have been the subject of considerable research the past two decades. See, e.g., Reitz *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37, 3561-78 (1994); Michael *et al.*, *J. Med. Chem.*, 36, 3431-36 (1993) (immunomodulatory guanosine analogs having substituents at the 7-and/or 8-positions); Patent No. 5,821,236 to Krenitsky *et al.* (disclosing 6-alkoxy derivatives of arabinofuranosyl purine derivatives that are useful for tumor therapy); U.S. Patent No. 5,041,426 to Robins *et al.* (certain pyrimido[4,5-d]pyridimine nucleosides are disclosed in as being effective in treatment against L1210 in BDF1 mice); Revankar *et al.*, *J. Med. Chem.*, 27, 1489-96 (1984) (3-Deazaguanine nucleosides and nucleotides demonstrating significant broad spectrum antiviral activity against certain DNA and RNA viruses);

[0007] A number of compounds known to be immunostimulants have recently been identified in the literature as TLR7 ligands, *see, e.g.*, Heil *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 33(11), 2987-97 (2003), Lore *et al.*, *J. Immunol.*, 171(8), 4320-8 (2003), Nagase *et al.*, *J. Immunol.*, 171(8), 3977-82 (2003), Mohty *et al.*, *J. Immunol.*, 171(7), 3385-93 (2003), Pinhal-Enfield, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 163(2), 711-21 (2003), Doxsee *et al*, *J. Immunol.*, 171(3), 1156-63 (2003), Bottcher *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 344(1), 17-20 (2003), Kaisho *et al.*, *Curr. Mol. Med.*, 3(4), 373-85 (2003), Okada *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 33(4), 1012-9 (2003), Edwards *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 33(4), 827-33 (2003), Akira *et al.*, *Immunol. Lett.*, 85(2), 85-95 (2003), Ito *et al.*, *Hum. Immunol.*, 63(12), 1120-5 (2002), Rothenfusser *et al.*, *Hum. Immunol.*, 63(12), 1111-9 (2002), Yamamoto *et al.*, *J. Immunol.*, 169(12), 6668-72 (2002), Gibson *et al.*, *Cell Immunol.*, 218(1-2), 74-86 (2002), Horng *et al.*, *Nature*, 420 (6913), 329-33 (2002), Yamamoto *et al.*, *Nature*, 420(6913), 324-9 (2002), Applequist *et al.*, *Int. Immunol.*, 14(9), 1065-74 (2002), Sato *et al.*, *Int. Immunol.*, 14(7), 783-91 (2002); Jurk *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3(6), 499 (2002); Hornung *et al.*, *J. Immunol.*, 168(9), 4531-7 (2002), Hemmi *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3(2), 196-200 (2002); Bruno *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 31(11), 3403-12 (2001); Jarrossay *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 31(11), 3388-93 (2001); Miettinen *et al.*, *Genes Immun.*, 2(6), 349-55 (2001), Chuang *et al.*, *Eur. Cytokine Netw.*, 11(3), 372-8 (2000), and Du *et al.*, *Eur. Cytokine Netw.*, 11(3), 362-71 (2000).

[0008] These TLR7 ligands are known to stimulate immune responses *in vitro* and in animal species, and this has led to testing of the uses of these compounds for several therapeutic uses, including antiviral and cancer therapies. These compounds have been

characterized as analogs or derivatives of a) guanosine, b) imidazoquinoline, and c) pyrimidine. See Akira, *Current Opinion*, 15, 5-11 (2003). One member (imiquimod) of the imidazoquinoline chemical class has been found effective for treating topical genital infections by papilloma virus. A second member of the imidazoquinoline class, resiquimod, has been tested for the treatment of HCV, but this compound failed to show anti-HCV effect at tolerated oral doses. Pockros *et al.*, *Gastroenterology*, 124 (Suppl 1), A-766 (2003).

[0009] Thus, while there has been some limited use of TLR7 ligands for the treatment of immunological disease and viral infections; see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,041,426 and 4,880,784 to Robins *et al.* (3-ß-D-ribofuranosylthiazolo[4,5-d]pyridimines demonstrating significant immunoactivity, including murine spleen cell proliferation and in vivo activity against Semliki Forest virus); United States Patent Application Publication No. US 2003/0199461 and WO 03/045968 to Averett *et al.* (3-ß-D-ribofuranosylthiazolo[4,5-d]pyrimidine nucleosides demonstrating activity against acute and chronic infections of both RNA and DNA viruses); to date ligands have proved ineffective for the treatment or prevention of Hepatitis C virus.

[0010] It is also known that the oral administration of many purine nucleoside analogs are subject to difficulties arising from poor absorption, poor solubility, or degradation in the digestive tract as a result of acidic or alkaline conditions or the action of enzymes, and/or combinations of these phenomena. Thus there remains a need for purine nucleoside analogs with improved oral availability and administration that are used to modulate aspects of the immune system.

[0011] Moreover, immunomodulatory nucleosides have relatively poor oral tolerability when compared to that of the intravenous route. Also, the gastrointestinal tract presents a particular tolerability barrier to immunologic agents by virtue of the large amount of immune tissue associated with the intestinal wall (i.e., gut). Although this is an important biologic mechanism for preventing invasion of the body by gut flora, the immune tissue also may become preferentially affected after oral administration of immunomodulatory compounds because of the high local concentrations of the administered compound in the gut. This leads to undesirable side effects, for example in the case of immune activating agents there is observed gastroenteritis and localized hemorrhagic effects.

[0012] A solution to the problem of effective oral delivery of immunomodulators is not evident in the literature. Available evidence indicates that systemic levels of administered drugs in this class have been limited by gastrointestinal toxicities arising after

low oral doses. Therefore there remains a need for immunomodulating TLR7 ligands that have improved oral availability and reduced gastrointestinal irritancy.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

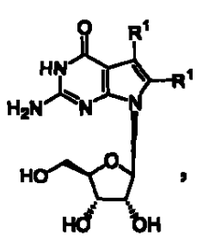
3.1 TLR7 Ligands

[0013] This invention encompasses novel methods for the treatment or prevention of hepatitis C viral infection, and novel pharmaceutical compositions which utilize TLR7 ligands or pharmaceutically acceptable salts, hydrates, metabolites or stereoisomers thereof.

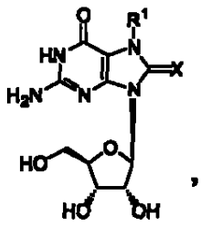
[0014] In one embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

[0015] In another embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand selected from analogs and derivatives of a) guanosine b) imidazoquinoline c) adenine, and d) pyrimidine.

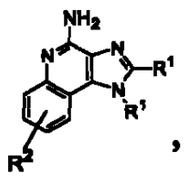
[0016] In another embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand selected from



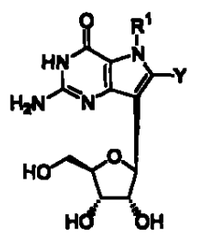
Ia



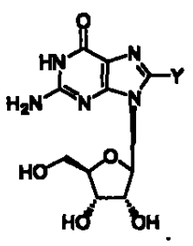
Ib



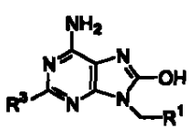
Ic



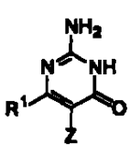
Id



Ie

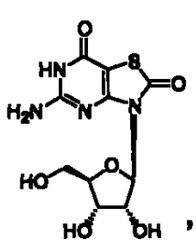


If



Ig

, and



Ih

wherein:

each R^1 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted aryl or heteroaryl;

R^2 is H, OH, SH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), aryl, or heteroaryl;

R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), -NH(alkyl), -NH(aryl), -NH(heteroaryl), -NH(R^4)(alkyl), -NH(R^4)(aryl), or -NH(R^4)(heteroaryl), wherein R^4 is a substituted or unsubstituted alkyl;

X is O or S;

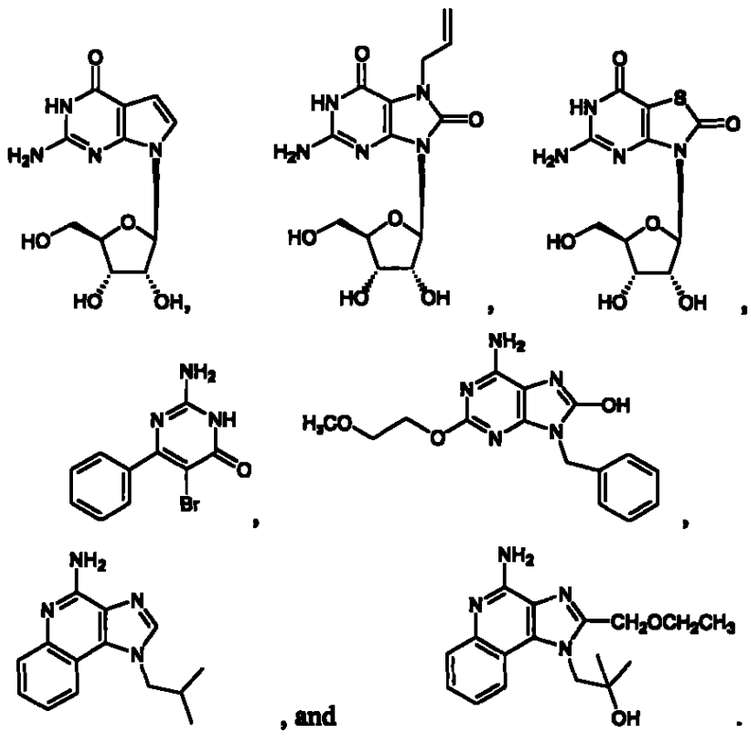
Y is H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, or a substituted or unsubstituted alkyl or aryl;

Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4;

or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

[0017] In another embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand selected from Formula Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, and Ih, wherein R^1 is H or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl; R^2 is H, OH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, or $-CH_2$-O-(alkyl); R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -S-(alkyl), or -NH(alkyl); X is O or S; Y is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4; and Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4.

[0018] In another embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand selected from



, and

or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof.

[0019] In one aspect, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a mammal in need thereof, preferably in a human in need thereof.

[0020] In an alternative embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising

administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand and a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

[0021] In an alternative embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand orally, mucosally, topically or transdermally.

[0022] In a preferred embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand parenterally.

[0023] In a separate embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand and an additional therapeutic agent, preferably an additional antiviral or immunomodulatory agent.

[0024] The invention also encompasses pharmaceutical compositions suitable for parenteral administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a TLR7 ligand of the invention in a sterile form; pharmaceutical compositions suitable for oral administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a TLR7 ligand of the invention, wherein such compositions are formulated to reduce exposure of the subepithelial immune anatomy to the TLR7 ligand while improving systemic absorption of the TLR7 ligand; pharmaceutical compositions suitable for mucosal administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a TLR7 ligand of the invention, wherein such compositions are formulated to reduce exposure of the subepithelial immune anatomy to the TLR7 ligand while improving systemic absorption of the TLR7 ligand; and pharmaceutical compositions suitable for topical administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a TLR7 ligand of the invention, wherein such compositions are formulated to reduce exposure of the subepithelial immune anatomy to the TLR7 ligand while improving systemic absorption of the TLR7 ligand. Depending on the specific tissue to be treated, additional components, such as penetration enhancers, may be used prior to, in conjunction with, or subsequent to treatment with active ingredients of the invention. In a preferred embodiment, each of these compositions is in single unit dosage form and comprising an amount of active ingredient sufficient to treat or prevent human infection by hepatitis C virus.

[0025] In a specific embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising a TLR7 ligand selected from analogs and derivatives of a) guanosine, b) imidazoquinoline, c) adenine, and d) pyrimidine.

[0026] In another specific embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising a TLR7 ligand selected from Formulas Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, and Ih, or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

3.2 TLR7 Ligand Prodrugs

[0027] This invention also encompasses novel methods for the treatment or prevention of hepatitis C viral infection, and novel pharmaceutical compositions which utilize TLR7 ligand prodrugs or pharmaceutically acceptable salts, hydrates, metabolites or stereoisomers thereof.

[0028] This invention also encompasses novel methods of treating diseases responsive to immuno therapy with immunologic agents, comprising orally administering a TLR7 ligand prodrug to a patient in need of immuno therapy, wherein the TLR7 prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the TLR7 ligand in the patient.

[0029] In one embodiment, the invention encompasses a method of treating a hepatitis C virus infection in a patient comprising orally administering to the patient a TLR7 ligand prodrug or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof, wherein the oral administration of the TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the TLR7 ligand while reducing undesirable side effects associated with TLR7 ligands. In a preferred embodiment, the TLR7 ligand prodrug is a masked TLR7 ligand prodrug.

[0030] In another embodiment, the invention also encompasses a method of treating diseases responsive to immuno therapy while reducing undesirable side effects associated with immunologic agents, comprising orally administering a TLR7 ligand prodrug to a patient in need of immuno therapy, wherein the TLR7 prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the TLR7 ligand in the patient. In a preferred embodiment, the TLR7 ligand prodrug is a masked TLR7 ligand prodrug.

[0031] In another embodiment, the oral administration of the TLR7 ligand prodrug improves the *in vivo* bioavailability of the TLR7 ligand. In a preferred embodiment, the oral administration of the TLR7 ligand prodrug achieves an *in vivo* effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 10% to 500% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone. In another preferred embodiment, the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves an *in*

vivo effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 50% to 200% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

[0032] In another embodiment, the oral administration of the TLR7 ligand prodrug reduces adverse side effects. In a preferred embodiment, the side effect comprises gastrointestinal irritancy, wherein gastrointestinal irritancy comprises hemorrhage, lesions, and emesis.

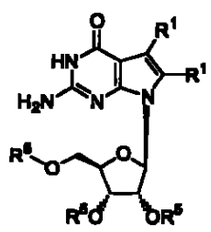
[0033] In another embodiment, the TLR7 ligand prodrug improves oral availability by at least 25% and reduces gastrointestinal irritancy by at least 50% in a patient relative to the oral administration of the TLR7 ligand alone. In another embodiment, the TLR7 ligand prodrug improves oral availability by at least 50% and reduces gastrointestinal irritancy by such that other toxicities become limiting in a patient relative to the oral administration of the TLR7 ligand alone.

[0034] In a preferred embodiment, the TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration that is 25% to 200% of the effective *in vivo* concentration of the TLR7 ligand in a patient after oral administration, with minimal gastrointestinal irritancy.

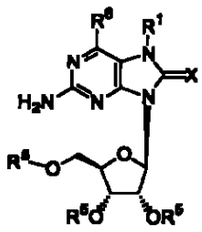
[0035] In one embodiment, the methods of the invention encompass administering to a patient in need thereof a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand selected from analogs and derivatives of a) guanosine, b) imidazoquinoline, c) adenine, and d) pyrimidine.

[0036] In another embodiment, the methods of the invention encompass administering to a patient in need thereof a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand selected from analogs and derivatives of a) guanosine, b) imidazoquinoline, c) adenine, and d) pyrimidine, wherein the prodrug is an (a) amide, carbamate, or amidine moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, carbonate, carbamate, ether, imidate, acetal, aminal, or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, (c) acetal or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand keto substituent, (d) imidate moiety after conversion of a TLR7 ligand carbonyl of an amido substituent, (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine, or (f) amine.

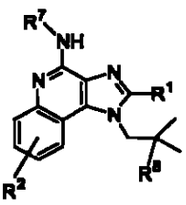
[0037] In another embodiment, the methods of the invention encompass administering to a patient in need thereof a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand selected from



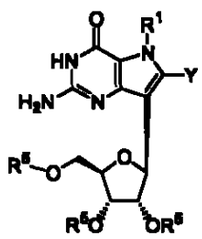
IIa ,



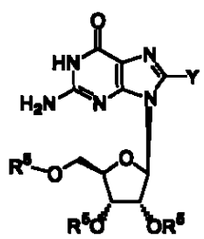
IIb ,



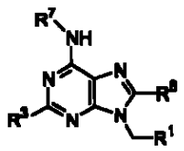
IIc ,



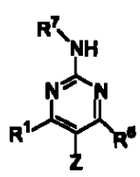
IId ,



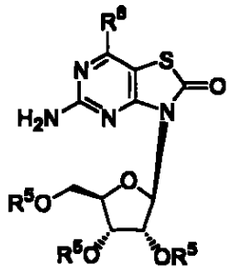
IIe ,



IIf ,



IIg , and



IIh ,

wherein:

each R^1 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted aryl or heteroaryl;

R^2 is H, OH, SH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), aryl, or heteroaryl;

R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), -NH(alkyl), -NH(aryl), -NH(heteroaryl), -NH(R^4)(alkyl), -NH(R^4)(aryl), or -NH(R^4)(heteroaryl);

R^4 is a substituted or unsubstituted alkyl;

R^5 is independently H, –C(O)(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group

$-C(O)CHNH_2R^9$;

R^6 is H, OR^{10}, or $N(R^{11})_2$;

R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted $-C(O)(C_{1-18}alkyl)$ or $-C(O)_2(C_{1-18}alkyl)$;

R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), $-OCO_2(C_{1-18}alkyl)$, $-OC(O)(C_{1-18}alkyl)$, or a racemic, L-, or D-amino acid group $-OC(O)CHNH_2R^1$;

R^9 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, $C(O)CH(C_{1-6}$ alkyl$)NH_2$, or $-C(O)CH(CH_2$-aryl$)NH_2$;

R^{10} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, $-(CR^{12}R^{13})_t(C_6-C_{10}$ aryl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_3-C_{10}$ cycloalkyl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_4-C_{10}$ heterocyclic), $-(CR^{12}R^{13})_{t>1}OH$, $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}CO_2C_{1-18}$ alkyl, and $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alkyl, and SO_2(aryl), wherein t is an integer from 0 to 6 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, cycloalkyl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, $-NH_2$, -NH-alkyl, $-N(alkyl)_2$, -NH-aryl, -N(alkyl)(aryl), $-N(aryl)_2$, -NHCHO, -NHC(O)alkyl, -NHC(O)aryl, -N(alkyl)C(O)H, -N(alkyl)C(O)alkyl, -N(aryl)C(O)H, -N(aryl)C(O)alkyl, $-NHCO_2$alkyl, $-N(alkyl)CO_2$alkyl, $-NHC(O)NH_2$, $-N(alkyl)C(O)NH_2$, -NHC(O)NH-alkyl, $-NHC(O)$ $N(alkyl)_2$, -N(alkyl)C(O)NH-alkyl, $N(alkyl)C(O)$ $N(alkyl)_2$, $-NHSO_2$-alkyl, $-N(alkyl)SO_2$-alkyl, -C(O)alkyl, -C(O)aryl, -OC(O)alkyl, -OC(O)aryl, $-CO_2$-alkyl, $-CO_2$-aryl, $-CO_2H$, $-C(O)NH_2$, -C(O)NH-alkyl, $-C(O)N(alkyl)_2$, -C(O)NH-aryl, $-C(O)N(aryl)_2$, -C(O)N(alkyl)(aryl), -S(O)alkyl, -S(O)aryl, $-SO_2$alkyl, $-SO_2$aryl, $-SO_2NH_2$, $-SO_2$NH-alkyl, and $-SO_2N(alkyl)_2$;

R^{11} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_3-C_{10} cycloalkyl, or together with nitrogen forms a 5- or 6-membered heterocyclic ring;

R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, or C_{2-6} alkynyl;

R^{14} is H, C_{1-6} alkyl, or $-CH_2$-aryl;

X is O or S;

Y is H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, or a substituted or unsubstituted alkyl or aryl; and

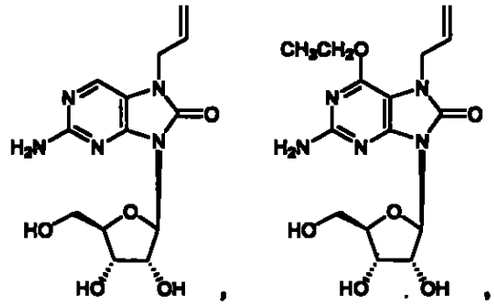
Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4;

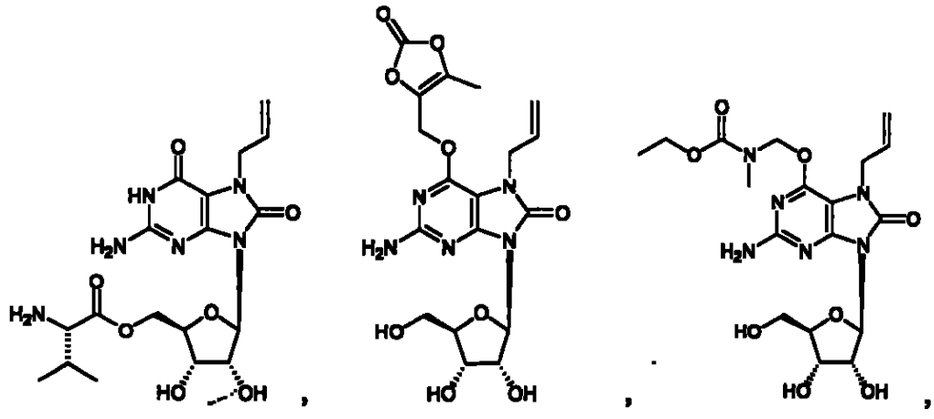
or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

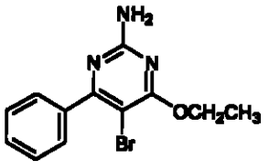
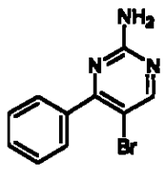
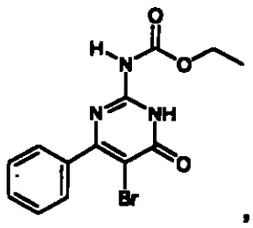
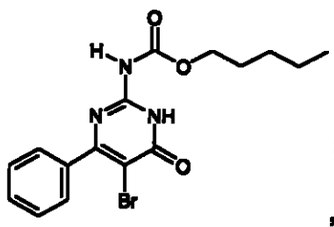
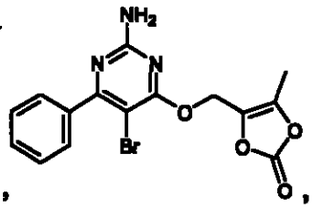
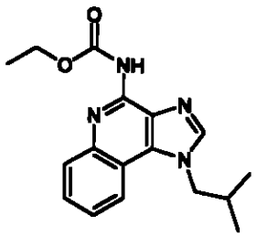
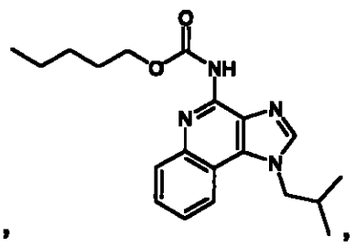
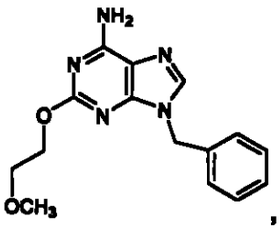
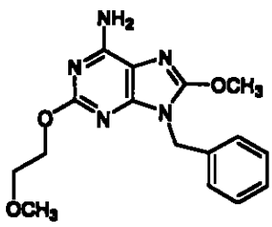
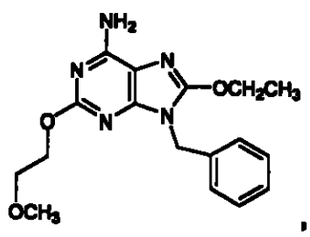
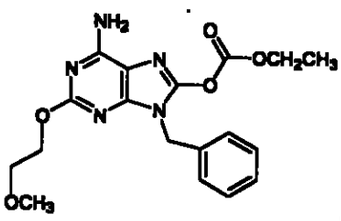
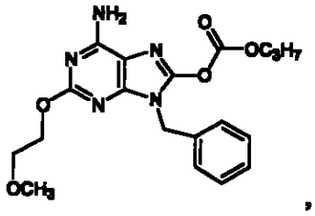
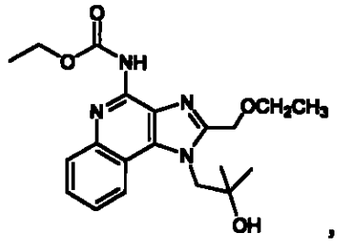
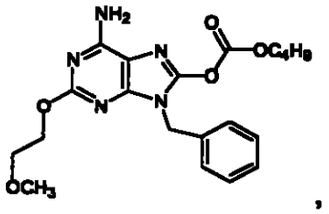
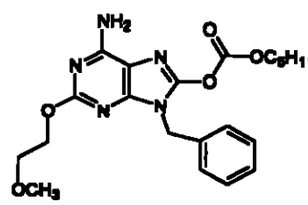
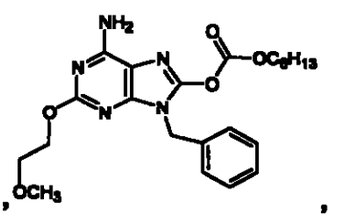
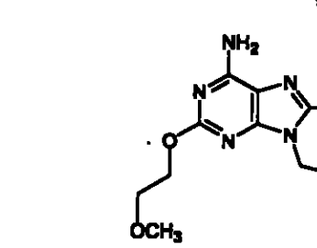
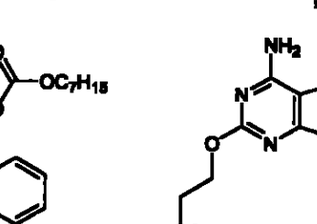
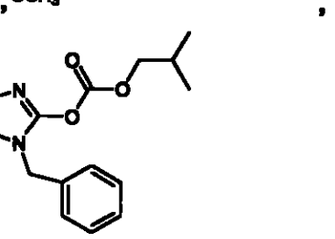
[0038] In another embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand selected from Formula IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIg, and IIh, wherein R^1 is H or

a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl; R^2 is H, OH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, or $-CH_2-O-(alkyl)$; R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -S-(alkyl), or -NH(alkyl); R^5 is independently H, $-C(O)(C_{1-18}alkyl)$, or a racemic, L-, or D- amino acid group $-C(O)CHNH_2R^9$, wherein R^9 is an unsubstituted alkyl; R^6 is H or OR^{10}, wherein R^{10} is independently C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, $-(CR^{12}R^{13})_t(C_6-C_{10}$ aryl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_4-C_{10}$ heterocyclic), and $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alkyl, wherein t is an integer from 0 to 4 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, aryl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with 1 to 3 substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, $-CO_2-$alkyl, $-CO_2-$aryl, -OC(O)alkyl, and -OC(O)aryl, and wherein R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, or C_{2-6} alkenyl; and R^{14} is H, $-CH_3$, or $-CH_2CH_3$; R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted $-C(O)(C_{1-18}alkyl)$ or $-C(O)_2(C_{1-18}alkyl)$; R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), $-OCO_2(C_{1-18}alkyl)$, or a racemic, L-, or D- amino acid group $-OC(O)CHNH_2R^1$; X is O or S; Y is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4; and Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4.

[0039] In specific embodiment, the invention encompasses a method of treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand selected from

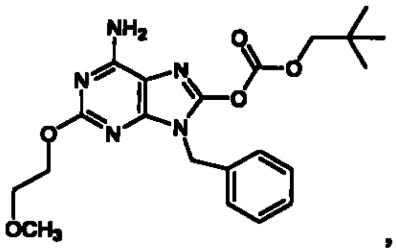
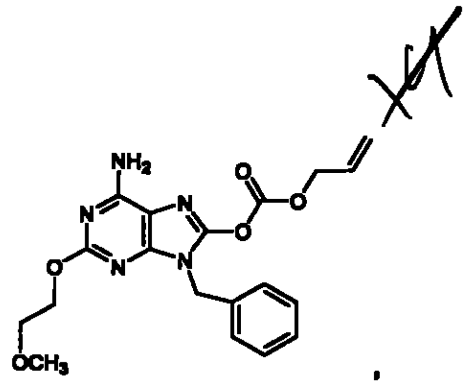


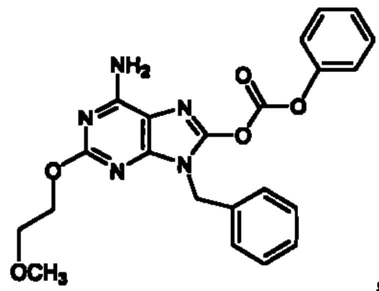
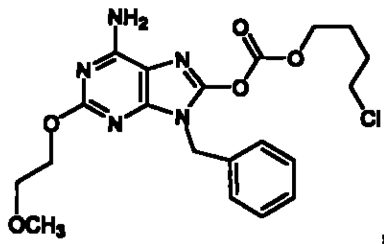


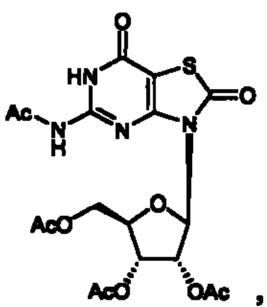
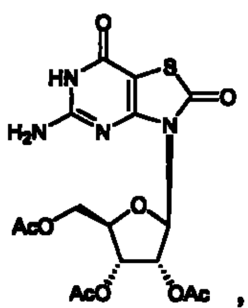
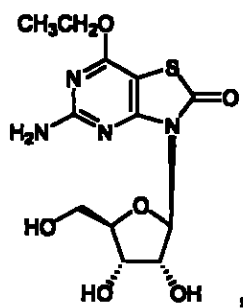
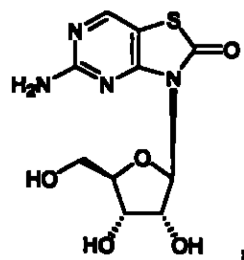

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

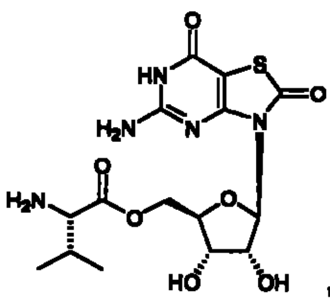
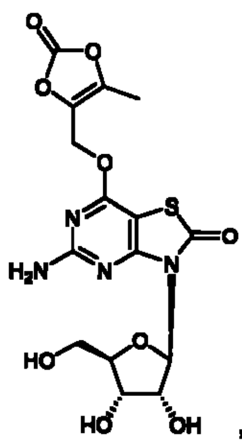
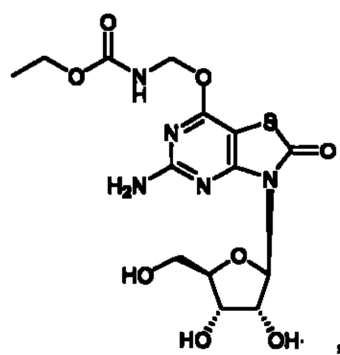
,

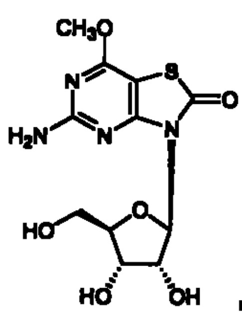
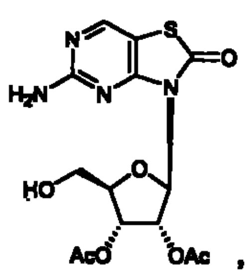
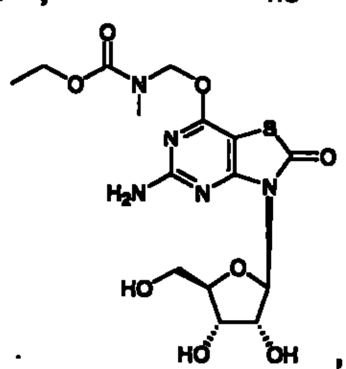
,

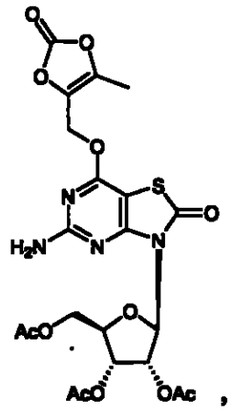
 ,  ,

 ,  ,

 ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,

 ,  ,  , and



or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

[0040] In another preferred embodiment of the invention, the TLR7 ligand prodrug is an amino acid ester prodrug of the TLR7 ligand. In another preferred embodiment, the amino acid ester prodrug of the TLR7 ligand is a valyl ester.

[0041] In one embodiment of the invention, R^5 is not a racemic, L-, or D- amino acid group $-C(O)CHNH_2R^9$. In another embodiment, R^5 is not a racemic, L-, or D- amino acid group $-C(O)CHNH_2R^9$ when the TLR7 ligand prodrug is selected from a compound of Formula IIh.

[0042] In another alternative embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand and a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

[0043] In a separate embodiment, the invention encompasses a method for treating or preventing hepatitis C virus infection in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically or prophylactically effective amount of a prodrug of a TLR7 ligand and an additional therapeutic agent, preferably an additional antiviral or immunomodulatory agent.

[0044] The invention also encompasses pharmaceutical compositions suitable for parenteral administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount a prodrug of a TLR7 ligand of the invention in a sterile form; pharmaceutical compositions suitable for parenteral administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a prodrug of a TLR7 ligand of the invention; pharmaceutical compositions suitable for mucosal administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a prodrug of a TLR7 ligand of the invention; and pharmaceutical compositions suitable for topical administration to a patient comprising a therapeutically or pharmaceutically acceptable amount of a prodrug of a TLR7 ligand of the invention. Depending on the specific tissue to

be treated, additional components, such as penetration enhancers, may be used prior to, in conjunction with, or subsequent to treatment with active ingredients of the invention. In a preferred embodiment, each of these compositions is in single unit dosage form and comprising an amount of active ingredient sufficient to treat or prevent human infection by hepatitis C virus.

[0045] In a specific embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising a prodrug of a TLR7 ligand selected from Formula IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIg, and IIh, or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

[0046] In another embodiment of the invention, and depending on the specific tissue to be treated, additional components including, but not limited to penetration enhancers, molecules which target the area of the infection and molecules which reduce the *in vivo* toxicity of the prodrug of a TLR7 ligand may be used prior to, in conjunction with, or subsequent to treatment with one or more prodrugs of TLR7 ligands of the invention.

[0047] The TLR7 ligand prodrugs are useful as immune system enhancers and have certain immune system properties including modulation, mitogenicity, augmentation, and/or potentiation or they are intermediates for compounds that have these properties. The compounds are expected to express effects after administration to a mammal on at least one of the cell populations characterized as the natural killer cells, macrophages, dendritic cells, and lymphocyte cells of the immune system of a host. Because of these properties they are useful as an anti-infective including, but not limited to antiviral agents, and as antitumor agents or as intermediates for the same. They can be used to treat an affected host by serving as the active ingredients of suitable pharmaceutical compositions.

[0048] In one aspect of the invention, TLR7 ligand prodrugs are utilized to treat the full range of viral diseases in mammals by administering to the mammal a therapeutically effective amount of the compounds. Viral diseases contemplated to be treated with TLR7 ligand prodrugs include acute and chronic infections caused by both RNA and DNA viruses. Without limiting in any way the range of viral infections that may be treated, TLR7 ligand prodrugs are particularly useful in the treatment of infections caused by adenovirus, cytomegalovirus, hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), flaviviruses including Yellow Fever virus, hepacivirus including hepatitis C virus (HCV), herpes simplex type 1 and 2, herpes zoster, human herpesvirus 6, human immunodeficiency virus (HIV), human papilloma virus (HPV), influenza A virus, influenza B virus, measles, parainfluenza virus, pestivirus, poliovirus, poxvirus (including smallpox and monkeypox virus), rhinovirus, coronovirus, respiratory syncytial virus (RSV), multiple families of viruses that cause hemorrhagic fevers, including the Arenaviruses (LCM, Junin virus,

Machupo virus, Guanarito virus, and Lassa Fever), the Bunyaviruses (Hanta viruses and Rift Valley Fever) and Filoviruses (Ebola and Marburg virus), a range of viral encephalitides including West Nile virus, LaCrosse virus, California Encephalitis virus, Venezuelan Equine Encephalitis virus, Eastern Equine Encephalitis virus, Western Equine Encephalitis virus, Japanese Encephalitis virus, Kysanur Forest virus, and tickborne viruses such as Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus.

[0049] In another aspect of the invention, TLR7 ligand prodrugs are utilized to treat bacterial, fungal, and protozoal infections in mammals by administering to the mammal a therapeutically effective amount of the prodrugs. The full range of pathogenic microorganisms is contemplated to be treatable by the TLR7 ligand prodrugs of the present invention, including without limitation those organisms that are resistant to antibiotics. The ability of TLR7 ligand prodrugs to activate multiple components of the immune system bypasses resistance mechanisms commonly found to reduce susceptibility to antibiotics, and thus treatment of infections in a mammal caused by such resistant microorganisms by TLR7 ligand prodrugs is a particular utility of the present invention.

[0050] In another aspect of the invention, TLR7 ligand prodrugs are utilized to treat tumors in mammals by administering to the mammal a therapeutically effective amount of the prodrugs. Tumors or cancers contemplated to be treated include both those arising from aberrations in normal cellular processes as well as those caused by virus, and the effect may involve inhibiting the spread of cancerous cells, accelerating the killing of cancerous cells, inhibiting transformation of virus-infected cells to a neoplastic state, inhibiting the spread of viruses from transformed cells to other normal cells, and/or arresting the growth of virus-transformed cells. The prodrugs of TLR7 ligands are expected to be useful against a broad spectrum of tumors including but not limited to carcinomas, sarcomas, and leukemias. Included in such a class are mammary, colon, bladder, lung, prostate, stomach, and pancreas carcinomas and lymphoblastic and myeloid leukemias.

[0051] In another aspect of the invention, a method of treating a mammal comprises administering a therapeutically and/or prophylactically effective amount of a pharmaceutical containing a TLR7 ligand prodrug of the invention. In this aspect the effect may relate to modulation of some portion of the mammal's immune system, especially modulation of cytokine activities of Th1 and Th2, including but not restricted to the interleukin family, e.g., IL-1 through IL-12, and other cytokines such as TNF alpha, and interferons including interferon alpha, interferon beta, and interferon gamma, and their downsteam effectors. Where modulation of Th1 and Th2 cytokines occurs, it is contemplated that the modulation may include stimulation of both Th1 and Th2, suppression of both Th1 and Th2, stimulation of either Th1 or Th2 and suppression of the

other, or a bimodal modulation in which one effect on Th1/Th2 levels (such as generalized suppression) occurs at a high concentration, while another effect (such as stimulation of either Th1 or Th2 and suppression of the other) occurs at a lower concentration.

[0052] In another aspect of this invention, pharmaceutical compositions containing a prodrug of a TLR7 ligand are administered in therapeutically effective doses to a mammal that is receiving immunomodulatory drugs not included in this invention. In a preferred aspect, the doses of the immunomodulatory drug are reduced below their customary effective dose, to reduce adverse effects. In a second preferred aspect, the immunomodulatory drug is used at its customary dose, but with an improved therapeutic effect when a prodrug of a TLR7 ligand is also administered.

[0053] In another aspect of the invention, pharmaceutical compositions containing a prodrug of a TLR7 ligand are administered in a therapeutically effective dose to a mammal that is receiving anti-infective drugs not included in this invention. In a preferred aspect of this invention, the pharmaceutical compositions containing a prodrug of a TLR7 ligand are administered in a therapeutically effective dose with anti-infective drug(s) that act directly upon the infectious agent to inhibit the growth of or kill the infectious agent.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0054] Figure 1 is a graphical depiction of plasma levels of isatoribine and interferon alpha in mice.

[0055] Figure 2 is a graphical depiction of Viral Load Changes in HCV infected Patients receiving isatoribine.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5.1 DEFINITIONS

[0056] Where the following terms are used in this specification, they are used as defined below:

[0057] The terms "comprising" and "including" are used herein in their open, non-limiting sense.

[0058] The term "nucleoside" refers to a compound composed of any pentose or modified pentose moiety attached to a specific position of a heterocycle or to the natural position of a purine (9-position) or pyrimidine (1-position) or to the equivalent position in an analog.

[0059] The term "purine" refers to nitrogenous bicyclic heterocycles.

[0060] The term "D-nucleosides" refers to the nucleoside compounds that have a D-ribose sugar moiety (e.g., Adenosine).

[0061] The term "L-nucleosides" refers to the nucleoside compounds that have a L-ribose sugar moiety.

[0062] The term "immunomodulator" refers to natural or synthetic products capable of modifying the normal or aberrant immune system through stimulation or suppression..

[0063] The term "NOAEL" is the No Observed Adverse Event Level, which is a toxicology term for the dose of drug that results in no significant toxicity under the specified conditions of dose level, frequency, duration in a selected species.

[0064] "Ligand" means a low molecular weight molecule capable of binding to a biologic receptor. A ligand may be either an agonist or an antagonist, or may have no effect.

[0065] An "agonist" is a ligand that, upon binding, stimulates the receptor to exert a biologic response that is consistent with the normal biologic activity of the receptor.

[0066] An "antagonist" is a ligand that, upon binding, causes the receptor to not exert the normal biologic activity of the receptor.

[0067] The term "mammal" includes both animals and humans.

[0068] The term "preventing" refers to the ability of a compound or composition of the invention to prevent a disease identified herein in mammals diagnosed as having the disease or who are at risk of developing such disease. The term also encompasses preventing further progression of the disease in mammals who are already suffering from or have symptoms of such disease.

[0069] The term "treating" refers to:

(i) preventing a disease, disorder, or condition from occurring in a mammal that may be predisposed to the disease, disorder and/or condition, but has not yet been diagnosed as having it;

(ii) inhibiting the disease, disorder, or condition, i.e., arresting its development; and

(iii) relieving the disease, disorder, or condition, i.e., causing regression of the disease, disorder, and/or condition.

[0070] The terms "α" and "β" indicate the specific stereochemical configuration of a substituent at an asymmetric carbon atom in a chemical structure as drawn.

[0071] The terms "patient" or "subject" mean an animal (e.g., cow, horse, sheep, pig, chicken, turkey, quail, cat, dog, mouse, rat, rabbit, guinea pig, etc.) or a mammal, including chimeric and transgenic animals and mammals. In the treatment or prevention of HCV infection, the term "patient" or "subject" preferably means a monkey or a human, most preferably a human. In a specific embodiment the patient or subject is infected by or exposed to the hepatitis C virus. In certain embodiments, the patient is a human infant (age

0-2), child (age 2-17), adolescent (age 12-17), adult (age 18 and up) or geriatric (age 70 and up) patient. In addition, the patient includes immunocompromised patients such as HIV positive patients, cancer patients, patients undergoing immunotherapy or chemotherapy. In a particular embodiment, the patient is a healthy individual, i.e., not displaying symptoms of other viral infections.

[0072] The term a "therapeutically effective amount" refers to an amount of the TLR7 ligand or prodrug of a TLR7 ligand of the invention sufficient to provide a benefit in the treatment or prevention of viral disease, to delay or minimize symptoms associated with viral infection or viral-induced disease, or to cure or ameliorate the disease or infection or cause thereof. In particular, a therapeutically effective amount means an amount sufficient to provide a therapeutic benefit *in vivo*. Used in connection with an amount of a compound of the invention, the term preferably encompasses a non-toxic amount that improves overall therapy, reduces or avoids symptoms or causes of disease, or enhances the therapeutic efficacy of or synergies with another therapeutic agent.

[0073] The term a "prophylactically effective amount" refers to an amount of a compound of the invention or other active ingredient sufficient to result in the prevention of infection, recurrence or spread of viral infection. A prophylactically effective amount may refer to an amount sufficient to prevent initial infection or the recurrence or spread of the infection or a disease associated with the infection. Used in connection with an amount of a compound of the invention, the term preferably encompasses a non-toxic amount that improves overall prophylaxis or enhances the prophylactic efficacy of or synergizes with another prophylactic or therapeutic agent.

[0074] The term "in combination" refers to the use of more than one prophylactic and/or therapeutic agents simultaneously or sequentially and in a manner that their respective effects are additive or synergistic.

[0075] The term "pharmaceutically acceptable salts" refer to salts prepared from pharmaceutically acceptable non- toxic acids or bases including inorganic acids and bases and organic acids and bases. If the inventive TLR7 ligand prodrug is a base, the desired pharmaceutically acceptable salt may be prepared by any suitable method available in the art, for example, treatment of the free base with an inorganic acid, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, or with an organic acid, such as acetic acid, maleic acid, succinic acid, mandelic acid, fumaric acid, malonic acid, pyruvic acid, oxalic acid, glycolic acid, salicylic acid, a pyranosidyl acid, such as glucuronic acid or galacturonic acid, an alpha-hydroxy acid, such as citric acid or tartaric acid, an amino acid, such as aspartic acid or glutamic acid, an aromatic acid, such as benzoic acid or cinnamic acid, a sulfonic acid, such as p-toluenesulfonic acid or

ethanesulfonic acid, or the like. If the inventive TLR7 ligand prodrug is an acid, the desired pharmaceutically acceptable salt may be prepared by any suitable method, for example, treatment of the free acid with an inorganic or organic base, such as an amine (primary, secondary or tertiary), an alkali metal hydroxide or alkaline earth metal hydroxide, or the like. Illustrative examples of suitable salts include organic salts derived from amino acids, such as glycine and arginine, ammonia, primary, secondary, and tertiary amines, and cyclic amines, such as piperidine, morpholine and piperazine, and inorganic salts derived from sodium, calcium, potassium, magnesium, manganese, iron, copper, zinc, aluminum and lithium.

[0076] The term "prodrug" is intended to mean any chemical entity that after administration is converted via metabolic actions or solvolysis to a different chemical entity that retains biological activity.

[0077] The term "TLR7 ligand prodrug" is intended to mean any chemical entity that after administration is converted via metabolic actions or solvolysis to a different chemical entity that retains biological activity and that is a ligand for TLR7. A TLR7 ligand prodrug may itself be a ligand for TLR7, or it may be "masked" in that it does not function efficiently as a TLR7 ligand.

[0078] The term "masked TLR7 ligand prodrug" is intended to mean any chemical entity that after administration is converted via metabolic actions or solvolysis to a different chemical entity that retains biological activity and that is a ligand for TLR7, and where the administered chemical entity is a less efficient ligand for TLR7 than the chemical entity arising from metabolic conversion or solvolysis.

[0079] The term "a pharmaceutically active metabolite" is intended to mean a pharmacologically active product produced through metabolism in the body of a specified compound or salt thereof. After entry into the body, most drugs are substrates for chemical reactions that may change their physical properties and biologic effects. These metabolic conversions, which usually affect the polarity of the TLR7 ligand, alter the way in which drugs are distributed in and excreted from the body. However, in some cases, metabolism of a drug is required for therapeutic effect. For example, many anticancer drugs of the anti-metabolite class must be converted to their active forms after they have been transported into a cancer cell.

[0080] As used herein, unless otherwise specified, the term "alkyl" means a saturated straight chain or branched non-cyclic hydrocarbon having from 1 to 20 carbon atoms, preferably 1-10 carbon atoms and most preferably 1-4 carbon atoms. Representative saturated straight chain alkyls include -methyl, -ethyl, -n-propyl, -n-butyl, -n-pentyl, -n-hexyl, -n-heptyl, -n-octyl, -n-nonyl and -n-decyl; while saturated branched alkyls include -

isopropyl, -sec-butyl, -isobutyl, -tert-butyl, -isopentyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 2-methylhexyl, 3-methylhexyl, 4-methylhexyl, 5-methylhexyl, 2,3-dimethylbutyl, 2,3-dimethylpentyl, 2,4-dimethylpentyl, 2,3-dimethylhexyl, 2,4-dimethylhexyl, 2,5-dimethylhexyl, 2,2-dimethylpentyl, 2,2-dimethylhexyl, 3,3-dimtheylpentyl, 3,3-dimethylhexyl, 4,4-dimethylhexyl, 2-ethylpentyl, 3-ethylpentyl, 2-ethylhexyl, 3-ethylhexyl, 4-ethylhexyl, 2-methyl-2-ethylpentyl, 2-methyl-3-ethylpentyl, 2-methyl-4-ethylpentyl, 2-methyl-2-ethylhexyl, 2-methyl-3-ethylhexyl, 2-methyl-4-ethylhexyl, 2,2-diethylpentyl, 3,3-diethylhexyl, 2,2-diethylhexyl, 3,3-diethylhexyl and the like. An alkyl group can be unsubstituted or substituted.

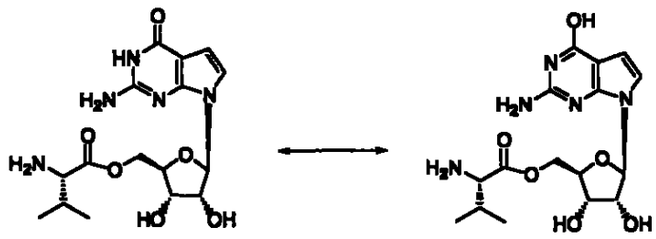
[0081] As used herein, unless otherwise specified the term "aryl" means a carbocyclic aromatic ring containing from 5 to 14 ring atoms. The ring atoms of a carbocyclic aryl group are all carbon atoms. Aryl ring structures include compounds having one or more ring structures such as mono-, bi-, or tricyclic compounds as well as benzo-fused carbocyclic moieties such as 5,6,7,8-tetrahydronaphthyl and the like. Preferably, the aryl group is a monocyclic ring or bicyclic ring. Representative aryl groups include phenyl, tolyl, anthracenyl, fluorenyl, indenyl, azulenyl, phenanthrenyl and naphthyl. A carbocyclic aryl group can be unsubstituted or substituted.

[0082] The term "substituted" means that the specified group or moiety bears one or more substituents. The term "unsubstituted" means that the specified group bears no substituents. A "substituted alkyl" or "substituted aryl" is substituted by one or more substituents including halogen (F, Cl, Br, or I), lower alkyl (C_{1-6}), -OH, $-NO_2$, -CN, $-CO_2H$, -O-lower alkyl, -aryl, -aryl-lower alkyl, $-CO_2CH_3$, $-CONH_2$, $-OCH_2CONH_2$, $-NH_2$, $-SO_2NH_2$, haloalkyl (e.g., $-CF_3$, $-CH_2CF_3$), -O-haloalkyl (e.g., $-OCF_3$, $-OCHF_2$), and the like.

[0083] As used herein and unless otherwise indicated, the term "optically pure" or "stereomerically pure" means a composition that comprises one stereoisomer of a compound and is substantially free of other stereoisomers of that compound. For example, a stereomerically pure compound having one chiral center will be substantially free of the opposite enantiomer of the compound. A typical stereomerically pure compound comprises greater than about 80% by weight of one stereoisomer of the compound and less than about 20% by weight of other stereoisomers of the compound, more preferably greater than about 90% by weight of one stereoisomer of the compound and less than about 10% by weight of the other stereoisomers of the compound, even more preferably greater than about 95% by weight of one stereoisomer of the compound and less than about 5% by weight of the other stereoisomers of the compound, and most preferably greater than about 97% by weight of one stereoisomer of the compound and less than about 3% by weight of the other stereoisomers of the compound. Since many of the compounds of the invention comprise

saccharides which can exist in either the D or L forms, the invention encompasses either or both D and L sugars. As such, for example, a stereomerically pure D sugar will be substantially free of the L form. In an alternative embodiment, the use of L forms of a TLR7 ligand will be substantially free of the D form. Thus, the methods and compositions disclosed herein include in an alternative embodiment the use of such levorotatory sugars or polymers made therefrom.

[0084] The compounds of the invention may exhibit the phenomenon of tautomerism. While Formulas I and II cannot expressly depict all possible tautomeric forms, it is to be understood that Formula I is intended to represent any tautomeric form of the depicted compound and are not to be limited merely to a specific compound form depicted by the formula drawings. For example, it is understood that regardless of whether or not the substituents are shown in their enol or their keto form, they represent the same compound (as shown in the Formula IIa example below).



5.2 Identification of TLR7 Ligands

[0085] Known TLR7 ligands include, but are not limited to (1) guanosine analogs, such as 7-deazaguanosine and related compounds, including but not limited to those described in Townsend, *J. Heterocyclic Chem*, 13, 1363 (1976), and Seela, *et al, Chem. Ber.*, 114(10), 3395-3402 (1981); 7-allyl, 8-oxo-guanosine (loxorabine) and related compounds, including but not limited to those described in Reitz, *et al.*, *J. Med. Chem*, 37, 3561-3578 (1994); 7-methyl, 9-deazaguanosine and related compounds including, but not limited to, those described in Girgis *et al.*, *J. Med. Chem.*, 33, 2750-2755 (1990); 8-bromoguanosine and other 8-halogen substituted purines compounds including, but not limited to, those described in United States Patent No. 4,643,992; 6-amino-9-benzyl-2-butoxy-9*H*-purin-8-ol, and other 2, 6, 8, 9 -substituted purines including, but not limited to, those described in Hirota *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45, 5419-5422 (2002), Henry *et al.*, *J. Med. Chem.*,33, 2127-2130 (1990), Michael *et al.*, *J. Med. Chem.*, 36, 3431-3436 (1993), Furneaux *et al.*, *J. Org. Chem.*, 64 (22), 8411-8412 (1999), Barrio *et al; J. Org. Chem.*, 61, 6084-6085 (1996), United States Patent No. 4,539,205, United States Patent No. 5,011,828, United States Patent No. 5,041,426, United States Patent No. 4,880,784, and International Patent Application Publication Nos. WO 94/07904; (2) imidazoquinolines, including but not limited to 1-(4-amino-2-ethoxymethyl-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)-2-methyl-propan-

2-ol (imiquimoid), as described in International Patent Application Publication No. WO 94/17043; 1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-ylamine (resiquimoid) as described in International Patent Application Publication No. WO 94/17043 and United States Patent Application Nos. 10/357,777 (United States Patent Application Publication No. US 2003/0195209), 10/357,733 (United States Patent Application Publication No. US 2003/0186949), 10/358,017(United States Patent Application Publication No. US 2003/0176458), 10/357,995(United States Patent Application Publication No. US 2003/0162806), 10/165,222 (United States Patent Application Publication No. US 2003/0100764), 10/011,921(United States Patent Application Publication No. US 2003/0065005) and 10/013,059 (United States Patent Application Publication No. US 2002/0173655); United States Patent No. 5,395,937; International Patent Application Publication No. WO 98/17279; and (3) pyrimidine derivatives, including but not limited to 2-amino-6-bromo-5-phenyl-3*H*-pyrimidin-4-one (bropirimine), and similar substituted pyrimidines including, but not limited to, those described in Wierenga *et al.*, *J. Med. Chem*, 23, 239-240 (1980), Fan *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.*, 30, 1273 (1993), Skilnick *et al.*, *J. Med. Chem.*, 29, 1499-1504 (1986), Fried, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 23, 237-239 (1980), and Fujiwara *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10(12) 1317-1320 (2000). The entireties of each of the patents, patent publications and publications identified herein are incorporated herein by reference.

[0086] In addition to the above TLR7 ligands, additional TLR7 ligands can be readily identified by known screening methods. See, e.g., Hirota *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45, 5419-5422 (2002); and Akira S. *et al.*, *Immunology Letters*, 85, 85-95 (2003). Using a variant of one of these known screening methods (as described in Section 6.1), analogs and derivatives of adenine were also identified as TLR7 ligands. Adenine derivatives known in the art are described in European Patent Application Publication Nos. EP 1 035 123, EP 1 043 021, and EP 0 882 727; United States Patent No. 6,376,501; United States Patent No. 6,329,381; United States Patent No.6,028,076, and United States Patent Application Publication No. US 2003/0162806.

[0087] The TLR7 ligands of Formulas Ia-Ih can be synthesized using methods known to one of skill in the art, particularly in light of the references and patents listed above.

5.3 Preparation of TLR7 Ligand Prodrugs

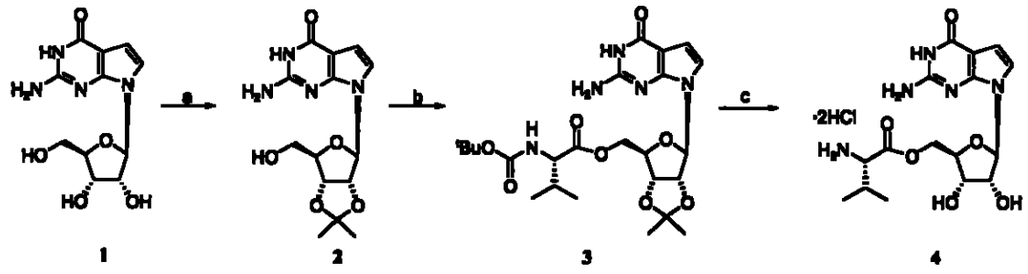
[0088] The TLR7 ligand prodrugs of the invention are prepared by making an (a) amide, carbamate, or amidine moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, carbonate, carbamate, ether, imidate, acetal, or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, (c) acetal or ketal moiety after conversion of a TLR7

ligand amine substituent, (d) imidate moiety after conversion of a TLR7 ligand carbonyl of an amido substituent, (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine, or (f) amine. For example, TLR7 ligand prodrugs are prepared by either (1) converting an hydroxyl (OH) substituents of the TLR7 ligand into an amino acid ester, or (2) making an amine substituent of the TLR7 ligand into an amide or carbamate. The process for preparing prodrugs is well known in the art and is described by *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry*, 1, 172-178, 949-982 (1995). See also Bertolini *et al.*, *J. Med. Chem.*, 40, 2011-2016 (1997); Shan, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 86 (7), 765-767; Bagshawe, *Drug Dev. Res.*, 34, 220-230 (1995); Bodor, *Advances in Drug Res.*, 13, 224-331 (1984); Bundgaard, *Design of Prodrugs* (Elsevier Press 1985); Larsen, *Design and Application of Prodrugs*, Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen *et al.*, eds., Harwood Academic Publishers, 1991); Dear *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 748, 281-293 (2000); Spraul *et al.*, *J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 10, 601-605 (1992); and Prox *et al.*, *Xenobiol.*, 3, 103-112 (1992).

[0089] Schemes 1-18 show a general procedure to prepare representative compounds of Formula II.

[0090] Schemes 1-6 describe how 5'-amino acid esters can be synthesized from analogs and derivatives of guanosine.

Scheme 1

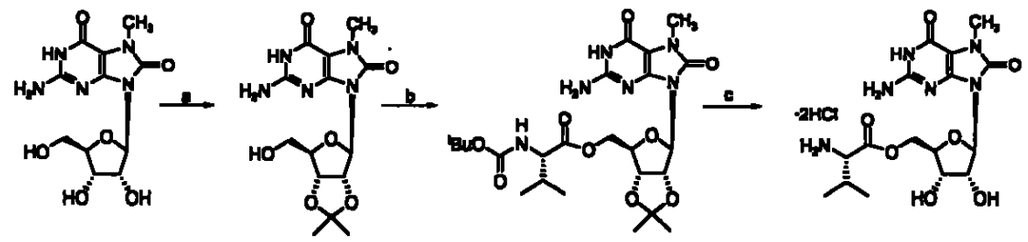


1 2 3 4

Townsend, *JHC*, 13, 1976, 1383
Seela, et al, *Chem. Ber.*, 114, *10*, 1981, 3395-3402

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) anh. HCl, *i*PrOAc, *i*PrOH

Scheme 2

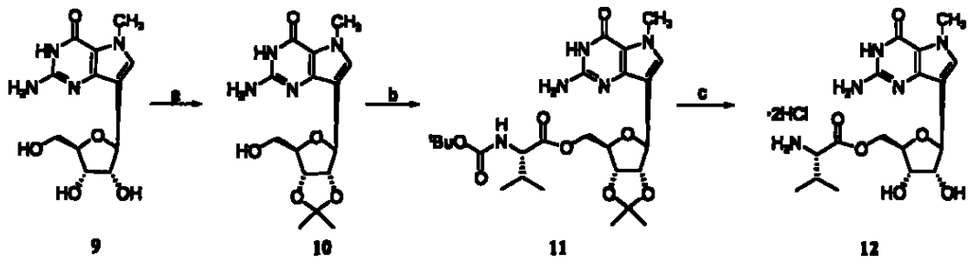


5 6 7 8

Reitz, et al, JMC, 37, 1994, 3561-3578

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) anh. HCl, *i*PrOAc, *i*PrOH

Scheme 3

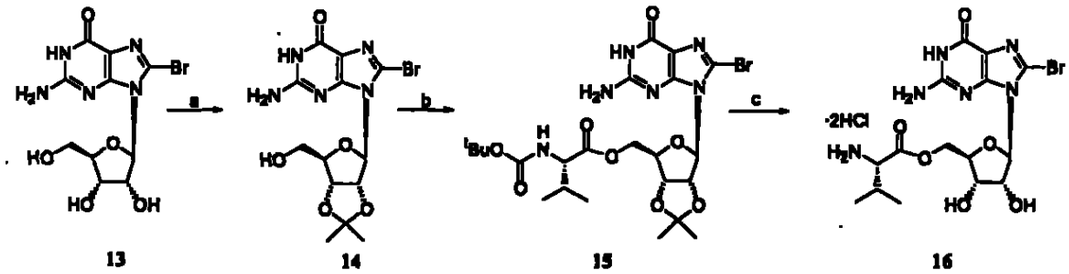


9 10 11 12

Girgis, et al, *JMC*, 33, 1990, 2760-2766

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) anh. HCl, *i*PrOAc, *i*PrOH

Scheme 4



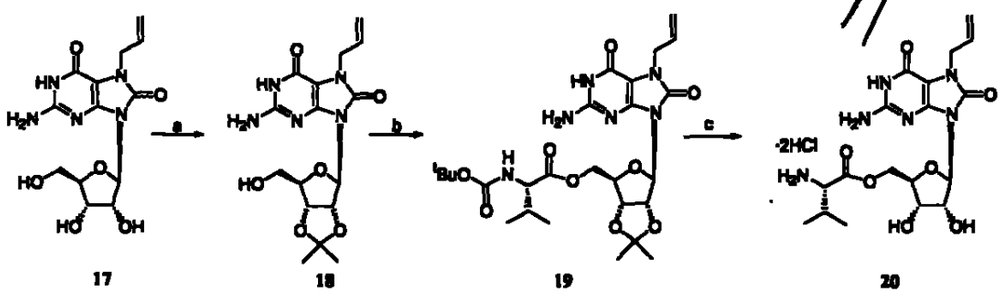
13 14 15 16

8-bromoguanosine [303136-78-0]
commercially available

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) anh. HCl, *i*PrOAc, *i*PrOH

[0091] In a typical synthetic route, the 2',3'-hydroxyl groups of the β-D-ribose moiety of Formulaa Ia, Ib, Id, Ie, or Ih can first protected, preferably with an acetonide as shown for **2**, **6**, **10**, or **14**. The free 5'-hydroxyl can then be subjected to a variety of esterification methods with a *N*-protected amino acid to form **3**, **7**, **11**, or **15**. The nitrogen of the amino acid ester and the 2',3'-hydroxyls of the ribose unit can then be subjected to various deprotection conditions, preferably concurrently, followed by salt formation of the free amine of the amino acid ester as illustrated for **4**, **8**, **12**, or **16**.

Scheme 5

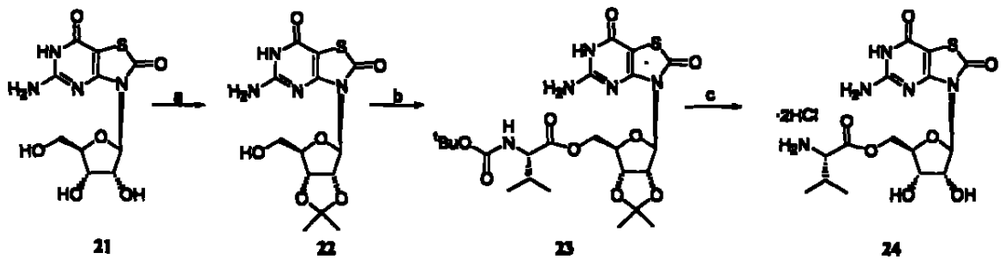


17 18 19 20

Ralitz, et al, JMC, 37, 1994, 3561-3578

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMF, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) AcCl, CH_3OH

Scheme 6



21 22 23 24

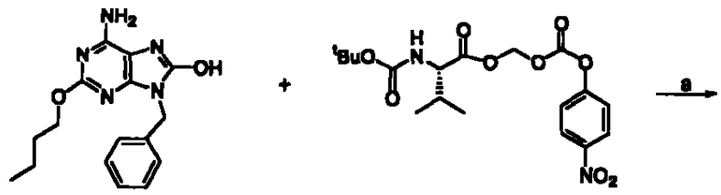
Kini, et al, JMC, 34, 1991, 3006-3010

a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt
c) anh. HCl, *i*PrOAc, *i*PrOH

[0092] In the synthetic routes shown in Schemes 5 and 6, the 2',3'-hydroxyl groups of the β-D-ribose moiety of compound 17 and 21 were first protected with an acetonide to form 18 and 22 respectively. The free 5'-hydroxyl was then subjected to esterification with a *N*-tert-butoxycarbonyl valine to form 19 and 23 respectively. The nitrogen of the amino acid ester and the 2',3'-hydroxyls of the ribose were concurrently deprotected forming the hydrochloride salts as illustrated for 20 and 24.

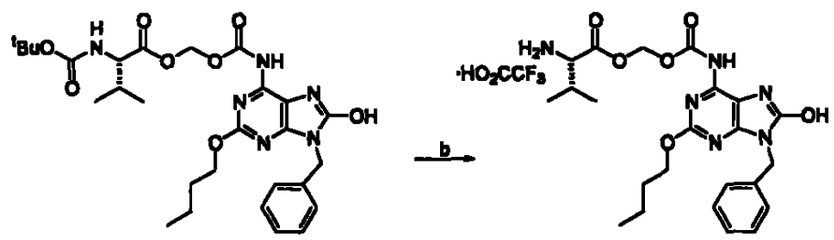
[0093] Schemes 7 and 8 describe how carbamates and carbonates can be synthesized from analogs and derivatives of adenine.

Scheme 7



25 Hirota, et al, *JMC*, 45, 2002, 5418-5422

26 Gangwar, et al, *JOC*, 62, 1997, 1356-1362



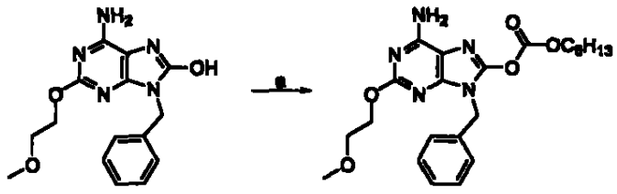
27

28 (Example of IIf)

a) HOBT, DMF,CH_2Cl_2, 0 °C
b) TFA, CH_2Cl_2, 0 °C - rt

[0094] In a typical synthetic route, the amino group of Formula If can be subjected to a variety of conditions with carbonates or chloroformates to form carbamates. In the case of 27, the N-terminal protected amine of the resulting amino acid ester can be subjected to deprotection conditions to form salts such as 28.

Scheme 8



29

Kurimota, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2004, p.1091-1099

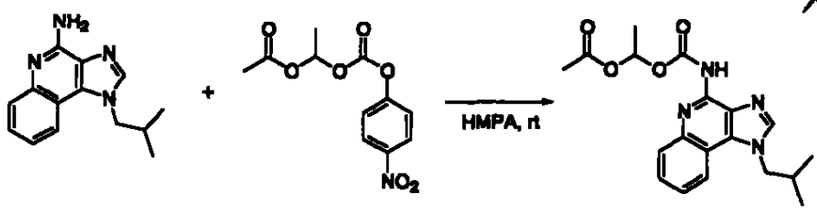
30

a) $C_6H_{13}OC(O)Cl$, $(IPr)_2NEt$, CH_2Cl_2, MeOH, DMAP, 0-35 °C

[0095] In Scheme 8 the hydroxyl group of adenine derivative 29 was esterified with n-hexyl chloroformate to give carbonate 30.

[0096] Schemes 9 and 10 describes how carbamates and can be synthesized from imidazoquinoline analogs.

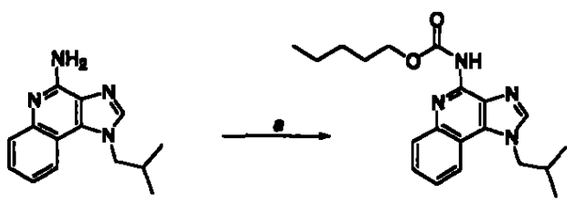
Scheme 9



31 Nicolaides et al, WO 94/17043 | 32 Alexander, et al, *JMC*, 31, 1988, 318-322 | 33 (Example of IIc)

[0097] In a typical synthetic route, the amino group of analogs of Formula Ic can be subjected to a variety of conditions with carbonates, pyrocarbonates or chloroformates to form carbamates.

Scheme 10



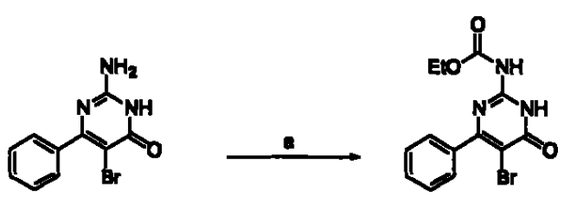
31 Nicolaides et al, WO 94/17043 | 34

a) $[C_5H_{11}OC(O)]_2O$, NEt_3, $CHCl_3$, 40 °C

[0098] In Scheme 10 imidazoquinoline 31 was treated with n-pentyl pyrocarbonate to give pentyl carbamate 34.

[0099] Schemes 11-12 described how to synthesize carbamates and imidates of pyrimidines of formula Ig.

Scheme 11



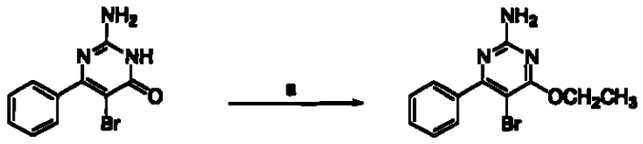
35 | 36 (Example of IIg)

Wierenga et al, *JMC*, 23, 1980, 239-240 | Fan et al, *JHC*, 30, 1993, 1273-1276

a) $[EtO(CO)]_2O$, NEt_3, DMF, 65 °C

[00100] In a typical synthesis of carbamates, the amino group of 35 was subjected to ethyl pyrocarbonate under conditions shown above to form carbamate 36.

Scheme 12



35 — 37 (Example of IIg)

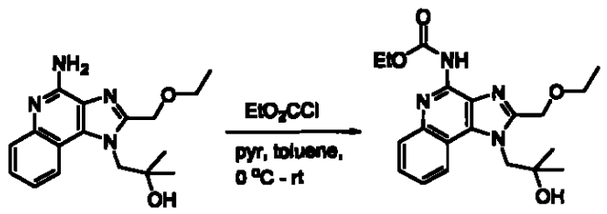
Wierenga et al, *JMC*, 23, 1980, 239-240

a) polymer supported PPh_3, EtOH, DEAD, THF, rt

[00101] In a typical synthesis of imidates, the amino group of 35 was subjected to ethyl alcohol under Mitsunobu type conditions shown above to form ethoxy derivative 37.

[00102] Scheme 13 describes how carbamates and can be synthesized from imidazoquinoline analogs.

Scheme 13

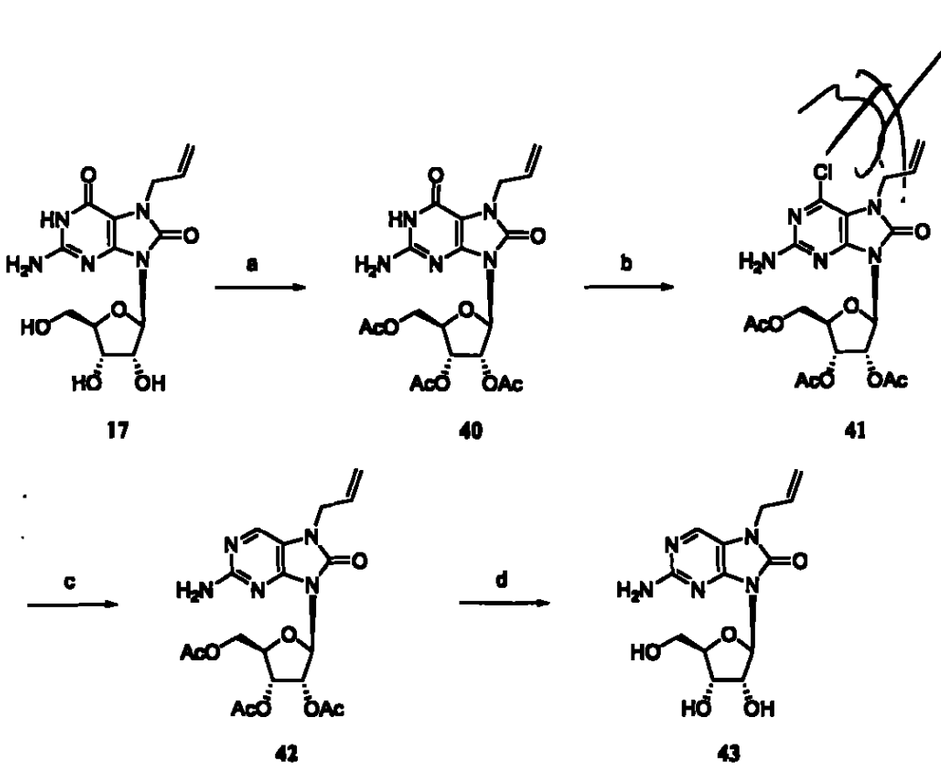


38 Nicolaides, et al, WO 94/17043 — 39 (Example of IIe)

[00103] In a typical synthetic route, the amino group of a derivative of Formula Ic can be subjected to a variety of conditions with carbonates, pyrocarbonates or chloroformates to form carbamates.

[00104] Scheme 14 shows a general procedure for preparing 7-allyl-2-Amino-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one.

Scheme 14

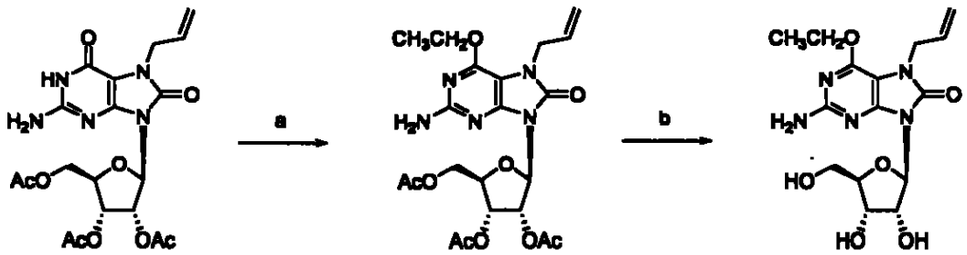


a) Ac_2O, DMAP, NEt_3, CH_3CN
b) $POCl_3$, 75 °C
c) Zn-Cu, AcOH, 70 °C
d) K_2CO_3, CH_3OH, rt

[00105] In a typical synthetic routes, 7-allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-1*H*-purine-6,8-dione **17**, was protected at the 2',3',5'-hydroxyl groups of the β-D-ribose, preferably with acyl groups as shown for **40**, can be subjected to a variety of conditions to convert the carbonyl at the C-6 position to various groups, including but not limited to halogen, as shown for **41**, that are susceptible to reduction. Following reduction under hetero- or homogeneous reaction conditions, the 2',3',5'-hydroxyls of the ribose unit are then subjected to appropriate deprotection conditions, to produce **43**. Compound **43** can further be appropriately modified if so desired.

[00106] Scheme 15 shows a general procedure for preparing 7-allyl-2-Amino-6-ethoxy-9-*β*-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one.

Scheme 15



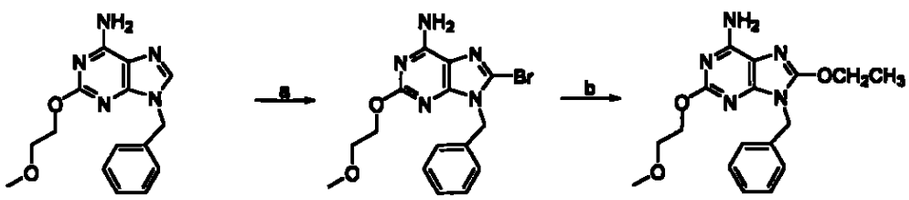
40 44 45

a) polymer supported PPh_3, EtOH, DEAD, THF, rt
b) K_2CO_3, CH_3OH, rt

[00107] In a typical synthetic route, 40 can be subjected to a variety of conditions to convert the carbonyl at the C-6 position to various imido-ethers, including but not limited to ethyl, as shown for 44. The 2',3',5'-hydroxyls of the ribose unit are then subjected to appropriate deprotection conditions, to produce 45. Compound 45 can further be appropriately modified if so desired.

[00108] Scheme 16 describes how ethers can be synthesized from analogs and derivatives of adenine.

Scheme 16



62 63 64

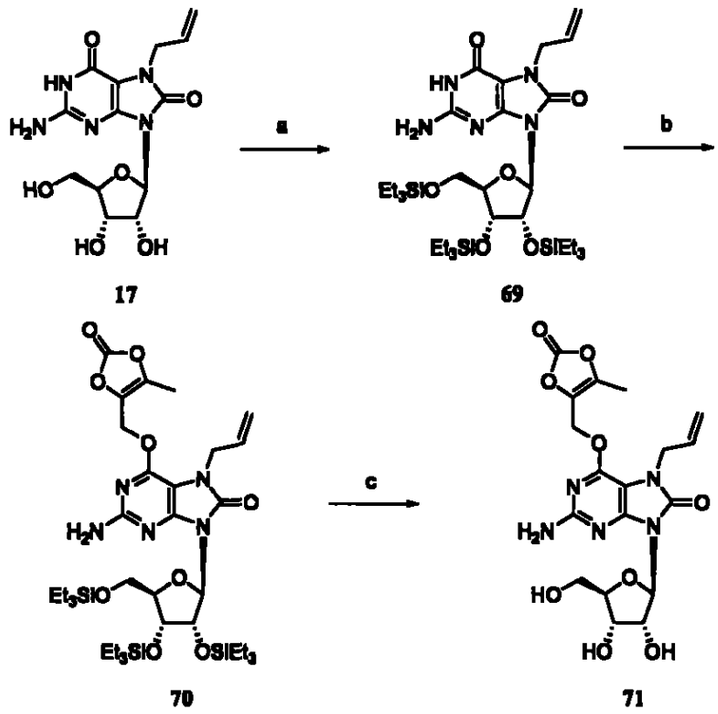
Kurimoto, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2004, p.1091-1099

a) Br_2, CH_2Cl_2
b) NaOEt, EtOH

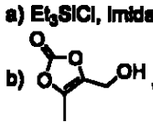
[00109] In a typical synthetic route, the adenine derivative can be halogenated at C-8. The halogen can then be displaced with an appropriate alkoxide to form derivatives such as 64.

[00110] Scheme 17 shows a general procedure for preparing 7-allyl-2-Amino-6-substituted alkoxy-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-ones.

Scheme 17



a) Et_3SiCl, Imidazole, DMF, rt

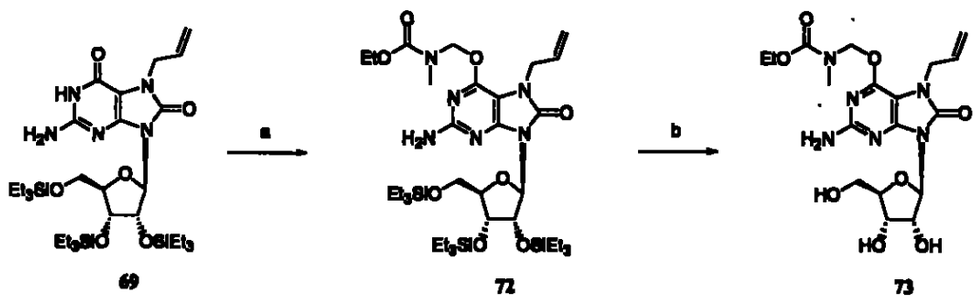
b)  , polymer supported PPh_3, DEAD, THF, rt

c) $HF{\cdot}NEt_3$, CH_3OH, rt

[00111] In a typical synthetic route, the hydroxyl groups on ribose of 17 can be protected as silyl ethers. The carbonyl at the C-6 position of 69 can be subjected to a variety of conditions to convert the carbonyl to various imido-ethers, including but not limited to the ether of 4-hydroxymethyl-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one, as shown for 70. The 2',3',5'-hydroxyls of the ribose unit are then subjected to appropriate deprotection conditions, to produce 71.

[00112] Scheme 18 shows a general procedure for preparing 7-allyl-2-Amino-6-substituted alkoxy-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-ones.

Scheme 18



a) $HOCH_2N(CH_3)CO_2Et$, polymer supported PPh_3, DEAD, THF, rt

b) $HF{\cdot}NEt_3$, CH_3OH, rt

[00113] The carbonyl at the C-6 position of 69 can be subjected to a variety of conditions to convert the carbonyl to various imido-ethers, including but not limited to the ether of *N*-methyl-N-(hydroxymethyl)urethane, as shown for 72. The 2',3',5'-hydroxyls of the ribose unit are then subjected to appropriate deprotection conditions, to produce 73. Compound 73 can further be appropriately modified if so desired.

5.4 METHODS OF TREATMENT AND PREVENTION OF HEPATITIS C VIRAL INFECTIONS

[00114] The present invention provides methods for treating or preventing a hepatitis C virus infection in a patient in need thereof.

[00115] The present invention further provides methods for introducing a therapeutically effective amount of a TLR7 ligand or a prodrug thereof, or combination of such ligands and prodrugs into the blood stream of a patient in the treatment and/or prevention of hepatitis C viral infections.

[00116] The magnitude of a prophylactic or therapeutic dose of a TLR7 ligand or TLR7 ligand prodrug of the invention or a pharmaceutically acceptable salt, solvate, hydrate, or stereoisomer thereof in the acute or chronic treatment or prevention of an infection will vary, however, with the nature and severity of the infection, and the route by which the active ingredient is administered. The dose, and in some cases the dose frequency, will also vary according to the infection to be treated, the age, body weight, and response of the individual patient. Suitable dosing regimens can be readily selected by those skilled in the art with due consideration of such factors.

[00117] The methods of the present invention are particularly well suited for human patients. In particular, the methods and doses of the present invention can be useful for immunocompromised patients including, but not limited to cancer patients, HIV infected patients, and patients with an immunodegenerative disease. Furthermore, the methods can be useful for immunocompromised patients currently in a state of remission. The methods and doses of the present invention are also useful for patients undergoing other antiviral treatments. The prevention methods of the present invention are particularly useful for patients at risk of viral infection. These patients include, but are not limited to health care workers, e.g., doctors, nurses, hospice care givers; military personnel; teachers; childcare workers; patients traveling to, or living in, foreign locales, in particular third world locales including social aid workers, missionaries, and foreign diplomats. Finally, the methods and compositions include the treatment of refractory patients or patients resistant to treatment such as resistance to viral polymerase inhibitors, protease inhibitors, etc.

<u>Doses</u>

[00118] Toxicity and efficacy of the compounds of the invention can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) and the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD_{50}/ED_{50}.

[00119] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage of the compounds for use in humans. The dosage of such compounds lie preferably within a range of circulating concentrations that include the ED_{50} with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC_{50} (*i.e.*, the concentration of the test compound that achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture; alternatively, the dose of the TLR7 ligand prodrug may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range of the TLR7 ligand that corresponds to the concentration required to achieve a fixed magnitude of response. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

[00120] The protocols and compositions of the invention are preferably tested *in vitro*, and then *in vivo*, for the desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, *in vitro* assays which can be used to determine whether administration of a specific therapeutic protocol is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which cells that are responsive to the effects of the TLR7 ligands are exposed to the ligand and the magnitude of response is measured by an appropriate technique. The assessment of the TLR7 ligand potency is then evaluated with respect to the TLR7 ligand prodrug potency, and the degree of conversion of the TLR7 ligand prodrug. Compounds for use in methods of the invention can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to in rats, mice, chicken, cows, monkeys, rabbits, hamsters, etc. The compounds can then be used in the appropriate clinical trials.

[00121] The magnitude of a prophylactic or therapeutic dose of a prodrug of a TLR7 ligand of the invention or a pharmaceutically acceptable salt, solvate, hydrate, or stereoisomer thereof in the acute or chronic treatment or prevention of an infection or condition will vary with the nature and severity of the infection, and the route by which the active ingredient is administered. The dose, and perhaps the dose frequency, will also vary according to the infection to be treated, the age, body weight, and response of the individual

patient. Suitable dosing regimens can be readily selected by those skilled in the art with due consideration of such factors. In one embodiment, the dose administered depends upon the specific compound to be used, and the weight and condition of the patient. Also, the dose may differ for various particular TLR7 ligands prodrugs; suitable doses can be predicted on the basis of the aforementioned in vitro measurements, in particular by use of such measurements of the TLR7 ligand to which the TLR7 ligand prodrug is related, and on the basis of animal studies, such that smaller doses will be suitable for those TLR7 ligand prodrugs that show effectiveness at lower concentrations than other TLR7 ligand prodrugs when measured in the systems described or referenced herein. In general, the dose per day is in the range of from about 0.001 to 100 mg/kg, preferably about 1 to 25 mg/kg, more preferably about 5 to 15 mg/kg. For treatment of humans infected by hepatitis C viruses, about 0.1 mg to about 15 g per day is administered in about one to four divisions a day, preferably 100 mg to 12 g per day, more preferably from 100 mg to 8000 mg per day. In a preferred embodiment for compounds such as prodrugs of 3-β-D-ribofuranosylthiazolo[4,5-d]pyrimidines from 200 mg to 8000 mg per day is administered in about one to four divisions a day. Additionally, the recommended daily dose ran can be administered in cycles as single agents or in combination with other therapeutic agents. In one embodiment, the daily dose is administered in a single dose or in equally divided doses. In a related embodiment, the recommended daily dose can be administered once time per week, two times per week, three times per week, four times per week or five times per week.

[00122] In a preferred embodiment, the compounds of the invention are administered to provide systemic distribution of the compound within the patient. In a related embodiment, the compounds of the invention are administered to produce a systemic effect in the body.

[00123] In another embodiment the compounds of the invention are administered via oral, mucosal (including sublingual, buccal, rectal, nasal, or vaginal), parenteral (including subcutaneous, intramuscular, bolus injection, intraarterial, or intravenous), transdermal, or topical administration. In a specific embodiment the compounds of the invention are administered via mucosal (including sublingual, buccal, rectal, nasal, or vaginal), parenteral (including subcutaneous, intramuscular, bolus injection, intraarterial, or intravenous), transdermal, or topical administration. In a further specific embodiment, the compounds of the invention are administered via oral administration. In a further specific embodiment, the compounds of the invention are not administered via oral administration.

[00124] Different therapeutically effective amounts may be applicable for different infections, as will be readily known by those of ordinary skill in the art. Similarly, amounts

sufficient to treat or prevent such infections, but insufficient to cause, or sufficient to reduce, adverse effects associated with conventional therapies are also encompassed by the above described dosage amounts and dose frequency schedules.

Combination Therapy

[00125] Specific methods of the invention further comprise the administration of an additional therapeutic agent (*i.e.*, a therapeutic agent other than a compound of the invention). In certain embodiments of the present invention, the compounds of the invention can be used in combination with at least one other therapeutic agent. Therapeutic agents include, but are not limited to antibiotics, antiemetic agents, antidepressants, and antifungal agents, anti-inflammatory agents, antiviral agents, anticancer agents, immunomodulatory agents, β-interferons, alkylating agents, hormones or cytokines. In a preferred embodiment the invention encompasses the administration of an additional therapeutic agent that is HCV specific or demonstrates anti-HCV activity.

[00126] The TLR7 ligands prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with antibiotics. For example, they can be formulated with a macrolide (*e.g.*, tobramycin (Tobi®)), a cephalosporin (*e.g.*, cephalexin (Keflex®), cephradine (Velosef®), cefuroxime (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixime (Suprax®) or cefadroxil (Duricef®)), a clarithromycin (*e.g.*, clarithromycin (Biaxin®)), an erythromycin (*e.g.*, erythromycin (EMycin®)), a penicillin (*e.g.*, penicillin V (V-Cillin K® or Pen Vee K®)) or a quinolone (*e.g.*, ofloxacin (Floxin®), ciprofloxacin (Cipro®) or norfloxacin (Noroxin®)),aminoglycoside antibiotics (*e.g.*, apramycin, arbekacin, bambermycins, butirosin, dibekacin, neomycin, neomycin, undecylenate, netilmicin, paromomycin, ribostamycin, sisomicin, and spectinomycin), amphenicol antibiotics (*e.g.*, azidamfenicol, chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol), ansamycin antibiotics (*e.g.*, rifamide and rifampin), carbacephems (*e.g.*, loracarbef), carbapenems (*e.g.*, biapenem and imipenem), cephalosporins (*e.g.*, cefaclor, cefadroxil, cefamandole, cefatrizine, cefazedone, cefozopran, cefpimizole, cefpiramide, and cefpirome), cephamycins (*e.g.*, cefbuperazone, cefmetazole, and cefminox), monobactams (*e.g.*, aztreonam, carumonam, and tigemonam), oxacephems (*e.g.*, flomoxef, and moxalactam), penicillins (*e.g.*, amdinocillin, amdinocillin pivoxil, amoxicillin, bacampicillin, benzylpenicillinic acid, benzylpenicillin sodium, epicillin, fenbenicillin, floxacillin, penamccillin, penethamate hydriodide, penicillin o-benethamine, penicillin 0, penicillin V, penicillin V benzathine, penicillin V hydrabamine, penimepicycline, and phencihicillin potassium), lincosamides (*e.g.*, clindamycin, and lincomycin), amphomycin, bacitracin, capreomycin, colistin, enduracidin, enviomycin, tetracyclines (*e.g.*, apicycline, chlortetracycline, clomocycline, and demeclocycline), 2,4-diaminopyrimidines (*e.g.*,

brodimoprim), nitrofurans (*e.g.*, furaltadone, and furazolium chloride), quinolones and analogs thereof (*e.g.*, cinoxacin,, clinafloxacin, flumequine, and grepagloxacin), sulfonamides (*e.g.*, acetyl sulfamethoxypyrazine, benzylsulfamide, noprylsulfamide, phthalylsulfacetamide, sulfachrysoidine, and sulfacytine), sulfones (*e.g.*, diathymosulfone, glucosulfone sodium, and solasulfone), cycloserine, mupirocin and tuberin.

[00127] The TLR7 ligand prodrugs of the invention can also be administered or formulated in combination with an antiemetic agent. Suitable antiemetic agents include, but are not limited to, metoclopromide, domperidone, prochlorperazine, promethazine, chlorpromazine, trimethobenzamide, ondansetron, granisetron, hydroxyzine, acethylleucine monoethanolamine, alizapride, azasetron, benzquinamide, bietanautine, bromopride, buclizine, clebopride, cyclizine, dimenhydrinate, diphenidol, dolasetron, meclizine, methallatal, metopimazine, nabilone, oxyperndyl, pipamazine, scopolamine, sulpiride, tetrahydrocannabinols, thiethylperazine, thioproperazine, tropisetron, and mixtures thereof.

[00128] The TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an antidepressant. Suitable antidepressants include, but are not limited to, binedaline, caroxazone, citalopram, dimethazan, fencamine, indalpine, indeloxazine hydrocholoride, nefopam, nomifensine, oxitriptan, oxypertine, paroxetine, sertraline, thiazesim, trazodone, benmoxine, iproclozide, iproniazid, isocarboxazid, nialamide, octamoxin, phenelzine, cotinine, rolicyprine, rolipram, maprotiline, metralindole, mianserin, mirtazepine, adinazolam, amitriptyline, amitriptylinoxide, amoxapine, butriptyline, clomipramine, demexiptiline, desipramine, dibenzepin, dimetacrine, dothiepin, doxepin, fluacizine, imipramine, imipramine N-oxide, iprindole, lofepramine, melitracen, metapramine, nortriptyline, noxiptilin, opipramol, pizotyline, propizepine, protriptyline, quinupramine, tianeptine, trimipramine, adrafinil, benactyzine, bupropion, butacetin, dioxadrol, duloxetine, etoperidone, febarbamate, femoxetine, fenpentadiol, fluoxetine, fluvoxamine, hematoporphyrin, hypericin, levophacetoperane, medifoxamine, milnacipran, minaprine, moclobemide, nefazodone, oxaflozane, piberaline, prolintane, pyrisuccideanol, ritanserin, roxindole, rubidium chloride, sulpiride, tandospirone, thozalinone, tofenacin, toloxatone, tranylcypromine, L-tryptophan, venlafaxine, viloxazine, and zimeldine.

[00129] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an antifungal agent. Suitable antifungal agents include but are not limited to amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, fluconazole, intrathecal, flucytosine, miconazole, butoconazole, clotrimazole, nystatin, terconazole, tioconazole, ciclopirox, econazole, haloprogrin, naftifine, terbinafine, undecylenate, and griseofuldin.

[00130] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an anti-inflammatory agent. Useful anti-inflammatory agents include, but are not limited to, non-steroidal anti-inflammatory drugs such as salicylic acid, acetylsalicylic acid, methyl salicylate, diflunisal, salsalate, olsalazine, sulfasalazine, acetaminophen, indomethacin, sulindac, etodolac, mefenamic acid, meclofenamate sodium, tolmetin, ketorolac, dichlofenac, ibuprofen, naproxen, naproxen sodium, fenoprofen, ketoprofen, flurbinprofen, oxaprozin, piroxicam, meloxicam, ampiroxicam, droxicam, pivoxicam, tenoxicam, nabumetome, phenylbutazone, oxyphenbutazone, antipyrine, aminopyrine, apazone and nimesulide; leukotriene antagonists including, but not limited to, zileuton, aurothioglucose, gold sodium thiomalate and auranofin; steroids including, but not limited to, alclometasone diproprionate, amcinonide, beclomethasone dipropionate, betametasone, betamethasone benzoate, betamethasone diproprionate, betamethasone sodium phosphate, betamethasone valerate, clobetasol proprionate, clocortolone pivalate, hydrocortisone, hydrocortisone derivatives, desonide, desoximatasone, dexamethasone, flunisolide, flucoxinolide, flurandrenolide, halcinocide, medrysone, methylprednisolone, methprednisolone acetate, methylprednisolone sodium succinate, mometasone furoate, paramethasone acetate, prednisolone, prednisolone acetate, prednisolone sodium phosphate, prednisolone tebuatate, prednisone, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamcinolone diacetate, and triamcinolone hexacetonide; and other anti-inflammatory agents including, but not limited to, methotrexate, colchicine, allopurinol, probenecid, sulfinpyrazone and benzbromarone.

[00131] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with another antiviral agent. Useful antiviral agents include, but are not limited to, protease inhibitors, nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and nucleoside analogs. The antiviral agents include but are not limited to zidovudine, acyclovir, gangcyclovir, vidarabine, idoxuridine, trifluridine, levovirin, viramidine and ribavirin, as well as foscarnet, amantadine, rimantadine, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, the alpha-interferons, beta-interferons, gamma-interferons, adefovir, clevudine, entecavir, and pleconaril.

[00132] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an immunomodulatory agent. Immunomodulatory agents include, but are not limited to, methothrexate, leflunomide, cyclophosphamide, cyclosporine A, mycophenolate mofetil, rapamycin (sirolimus), mizoribine, deoxyspergualin, brequinar, malononitriloamindes (e.g., leflunamide), T cell receptor modulators, and cytokine receptor modulators, peptide mimetics, and antibodies

(e.g., human, humanized, chimeric, monoclonal, polyclonal, Fvs, ScFvs, Fab or F(ab)2 fragments or epitope binding fragments), nucleic acid molecules (e.g., antisense nucleic acid molecules and triple helices), small molecules, organic compounds, and inorganic compounds. Examples of T cell receptor modulators include, but are not limited to, anti-T cell receptor antibodies (e.g., anti-CD4 antibodies (e.g., cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1® (IDEC and SKB), mAB 4162W94, Orthoclone and OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anti-CD3 antibodies (e.g., Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), or Rituxan (IDEC)), anti-CD5 antibodies (e.g., an anti-CD5 ricin-linked immunoconjugate), anti-CD7 antibodies (e.g., CHH-380 (Novartis)), anti-CD8 antibodies, anti-CD40 ligand monoclonal antibodies (e.g., IDEC-131 (IDEC)), anti-CD52 antibodies (e.g., CAMPATH 1H (Ilex)), anti-CD2 antibodies, anti-CD11a antibodies (e.g., Xanelim (Genentech)), and anti-B7 antibodies (e.g., IDEC-114 (IDEC)) and CTLA4-immunoglobulin. Examples of cytokine receptor modulators include, but are not limited to, soluble cytokine receptors (e.g., the extracellular domain of a TNF-α receptor or a fragment thereof, the extracellular domain of an IL-1β receptor or a fragment thereof, and the extracellular domain of an IL-6 receptor or a fragment thereof), cytokines or fragments thereof (e.g., interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF-α, interferon (IFN)-α, IFN-β, IFN-γ, and GM-CSF), anti-cytokine receptor antibodies (e.g., anti-IFN receptor antibodies, anti-IL-2 receptor antibodies (e.g., Zenapax (Protein Design Labs)), anti-IL-4 receptor antibodies, anti-IL-6 receptor antibodies, anti-IL-10 receptor antibodies, and anti-IL-12 receptor antibodies), anti-cytokine antibodies (e.g., anti-IFN antibodies, anti-TNF-α antibodies, anti-IL-1β antibodies, anti-IL-6 antibodies, anti-IL-8 antibodies (e.g., ABX-IL-8 (Abgenix)), and anti-IL-12 antibodies).

[00133] The TLR7 ligands or TLR ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an agent which inhibits viral enzymes, including but not limited to inhibitors of HCV protease, such as BILN 2061 and inhibitors of NS5b polymerase such as NM107 and its prodrug NM283 (Idenix Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA).

[00134] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an agent which inhibits HCV polymerase such as those described in Wu, Curr Drug Targets Infect Disord. 2003;3(3):207-19 or in combination with compounds that inhibit the helicase function of the virus such as those described in Bretner M, et al Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2003;22(5-8):1531, or with inhibitors of other HCV specific targets such as those described in Zhang X. IDrugs. 2002;5(2):154-8.

[00135] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an agent that inhibits viral replication.

[00136] The TLR7 ligands or TLR ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with cytokines. Examples of cytokines include, but are not limited to, interleukin-2 (IL-2), interleukin-3 (IL-3), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-7 (IL-7), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), interleukin 15 (IL-15), interleukin 18 (IL-18), platelet derived growth factor (PDGF), erythropoietin (Epo), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), granulocyte macrophage stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), prolactin, and interferon (IFN), e.g., IFN-alpha, and IFN-gamma).

[00137] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with hormones. Examples of hormones include, but are not limited to, luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), growth hormone (GH), growth hormone releasing hormone, ACTH, somatostatin, somatotropin, somatomedin, parathyroid hormone, hypothalamic releasing factors, insulin, glucagon, enkephalins, vasopressin, calcitonin, heparin, low molecular weight heparins, heparinoids, synthetic and natural opioids, insulin thyroid stimulating hormones, and endorphins.

[00138] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with β-interferons which include, but are not limited to, interferon beta-1a, interferon beta-1b.

[00139] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with α-interferons which include, but are not limited to, interferon alpha-1, interferon alpha-2a (roferon), interferon alpha-2b, intron, Peg-Intron, Pegasys, consensus interferon (infergen) and albuferon.

[00140] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an absorption enhancer, particularly those which target the lymphatic system, including, but not limited to sodium glycocholate; sodium caprate; N-lauryl-γ-D-maltopyranoside; EDTA; mixed micelle; and those reported in Muranishi Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 7-1-33, which is hereby incorporated by reference in its entirety. Other known absorption enhancers can also be used. Thus, the invention also encompasses a pharmaceutical composition comprising one or more TLR7 ligand prodrugs of the invention and one or more absorption enhancers.

[00141] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention can be administered or formulated in combination with an alkylating agent. Examples of alkylating agents include, but are not limited to nitrogen mustards, ethylenimines,

methylmelamines, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, mechlorethamine, cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, chlorambucil, hexamethylmelaine, thiotepa, busulfan, carmustine, streptozocin, dacarbazine and temozolomide.

[00142] The compounds of the invention and the other therapeutics agent can act additively or, more preferably, synergistically. In a preferred embodiment, a composition comprising a compound of the invention is administered concurrently with the administration of another therapeutic agent, which can be part of the same composition or in a different composition from that comprising the compounds of the invention. In another embodiment, a compound of the invention is administered prior to or subsequent to administration of another therapeutic agent. In a separate embodiment, a compound of the invention is administered to a patient who has not previously undergone or is not currently undergoing treatment with another therapeutic agent, particularly an antiviral agent.

[00143] In one embodiment, the methods of the invention comprise the administration of one or more TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention without an additional therapeutic agent.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND DOSAGE FORMS

[00144] Pharmaceutical compositions and single unit dosage forms comprising a TLR7 ligand or prodrug of the invention, or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate or stereoisomer thereof, are also encompassed by the invention. Individual dosage forms of the invention may be suitable for oral, mucosal (including sublingual, buccal, rectal, nasal, or vaginal), parenteral (including subcutaneous, intramuscular, bolus injection, intraarterial, or intravenous), transdermal, or topical administration. Pharmaceutical compositions and dosage forms of the invention typically also comprise one or more pharmaceutically acceptable excipients. Sterile dosage forms are also contemplated.

[00145] In an alternative embodiment,a pharmaceutical composition encompassed by this embodiment includes a TLR7 ligand or prodrug of the invention, or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate or stereoisomer thereof, and at least one additional therapeutic agent. Examples of additional therapeutic agents include, but are not limited to, those listed above in section 5.2.2.

[00146] The composition, shape, and type of dosage forms of the invention will typically vary depending on their use. For example, a dosage form used in the acute treatment of a disease or a related disease may contain larger amounts of one or more of the active ingredients it comprises than a dosage form used in the chronic treatment of the same disease. Similarly, a parenteral dosage form may contain smaller amounts of one or more of the active ingredients it comprises than an oral dosage form used to treat the same disease or disorder.

[00147] These and other ways in which specific dosage forms encompassed by this invention will vary from one another will be readily apparent to those skilled in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990). Examples of dosage forms include, but are not limited to: tablets; caplets; capsules, such as soft elastic gelatin capsules; cachets; troches; lozenges; dispersions; suppositories; ointments; cataplasms (poultices); pastes; powders; dressings; creams; plasters; solutions; patches; aerosols (e.g., nasal sprays or inhalers); gels; liquid dosage forms suitable for oral or mucosal administration to a patient, including suspensions (e.g., aqueous or non-aqueous liquid suspensions, oil-in-water emulsions, or a water-in-oil liquid emulsions), solutions, and elixirs; liquid dosage forms suitable for parenteral administration to a patient; and sterile solids (e.g., crystalline or amorphous solids) that can be reconstituted to provide liquid dosage forms suitable for parenteral administration to a patient.

[00148] Typical pharmaceutical compositions and dosage forms comprise one or more carriers, excipients or diluents. Suitable excipients are well known to those skilled in the art of pharmacy, and non-limiting examples of suitable excipients are provided herein. Whether a particular excipient is suitable for incorporation into a pharmaceutical composition or dosage form depends on a variety of factors well known in the art including, but not limited to, the way in which the dosage form will be administered to a patient. For example, oral dosage forms such as tablets may contain excipients not suited for use in parenteral dosage forms. The suitability of a particular excipient may also depend on the specific active ingredients in the dosage form.

[00149] This invention further encompasses anhydrous pharmaceutical compositions and dosage forms comprising active ingredients, since water can facilitate the degradation of some compounds. For example, the addition of water (e.g., 5%) is widely accepted in the pharmaceutical arts as a means of simulating long-term storage in order to determine characteristics such as shelf-life or the stability of formulations over time. See, e.g., Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 2d. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, pp. 379-80. In effect, water and heat accelerate the decomposition of some compounds. Thus, the effect of water on a formulation can be of great significance since moisture and/or humidity are commonly encountered during manufacture, handling, packaging, storage, shipment, and use of formulations.

[00150] Anhydrous pharmaceutical compositions and dosage forms of the invention can be prepared using anhydrous or low moisture containing ingredients and low moisture or low humidity conditions.

[00151] An anhydrous pharmaceutical composition should be prepared and stored such that its anhydrous nature is maintained. Accordingly, anhydrous compositions are preferably packaged using materials known to prevent exposure to water such that they can be included in suitable formulary kits. Examples of suitable packaging include, but are not limited to, hermetically sealed foils, plastics, unit dose containers (e.g., vials), blister packs, and strip packs.

[00152] The invention further encompasses pharmaceutical compositions and dosage forms that comprise one or more compounds that reduce the rate by which an active ingredient will decompose. Such compounds, which are referred to herein as "stabilizers," include, but are not limited to, antioxidants such as ascorbic acid, pH buffers, or salt buffers.

[00153] Like the amounts and types of excipients, the amounts and specific types of active ingredients in a dosage form may differ depending on factors such as, but not limited to, the route by which it is to be administered to patients. However, typical dosage forms of

the invention comprise TLR7 ligand prodrugs of the invention, or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomers thereof comprise 0.1 mg to 1500 mg per unit to provide doses of about 0.01 to 200 mg/kg per day.

Oral Dosage Forms

[00154] Pharmaceutical compositions of the invention that are suitable for oral administration can be presented as discrete dosage forms, such as, but are not limited to, tablets (e.g., chewable tablets), caplets, capsules, and liquids (e.g., flavored syrups). Such dosage forms contain predetermined amounts of active ingredients, and may be prepared by methods of pharmacy well known to those skilled in the art. See generally, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

[00155] Typical oral dosage forms of the invention are prepared by combining the active ingredient(s) in an intimate admixture with at least one excipient according to conventional pharmaceutical compounding techniques. Excipients can take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration. For example, excipients suitable for use in oral liquid or aerosol dosage forms include, but are not limited to, water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, and coloring agents. Examples of excipients suitable for use in solid oral dosage forms (e.g., powders, tablets, capsules, and caplets) include, but are not limited to, starches, sugars, micro-crystalline cellulose, diluents, granulating agents, lubricants, binders, and disintegrating agents.

[00156] Because of their ease of administration, tablets and capsules represent the most advantageous oral dosage unit forms, in which case solid excipients are employed. If desired, tablets can be coated by standard aqueous or nonaqueous techniques. Such dosage forms can be prepared by any of the methods of pharmacy. In general, pharmaceutical compositions and dosage forms are prepared by uniformly and intimately admixing the active ingredients with liquid carriers, finely divided solid carriers, or both, and then shaping the product into the desired presentation if necessary.

[00157] For example, a tablet can be prepared by compression or molding. Compressed tablets can be prepared by compressing in a suitable machine the active ingredients in a free-flowing form such as powder or granules, optionally mixed with an excipient. Molded tablets can be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent.

[00158] Examples of excipients that can be used in oral dosage forms of the invention include, but are not limited to, binders, fillers, disintegrants, and lubricants. Binders suitable for use in pharmaceutical compositions and dosage forms include, but are not limited to, corn starch, potato starch, or other starches, gelatin, natural and synthetic gums such as acacia, sodium alginate, alginic acid, other alginates, powdered tragacanth,

guar gum, cellulose and its derivatives (e.g., ethyl cellulose, cellulose acetate, carboxymethyl cellulose calcium, sodium carboxymethyl cellulose), polyvinyl pyrrolidone, methyl cellulose, pre-gelatinized starch, hydroxypropyl methyl cellulose, (e.g., Nos. 2208, 2906, 2910), microcrystalline cellulose, and mixtures thereof.

[00159] Examples of fillers suitable for use in the pharmaceutical compositions and dosage forms disclosed herein include, but are not limited to, talc, calcium carbonate (e.g., granules or powder), microcrystalline cellulose, powdered cellulose, dextrates, kaolin, mannitol, silicic acid, sorbitol, starch, pre-gelatinized starch, and mixtures thereof. The binder or filler in pharmaceutical compositions of the invention is typically present in from about 50 to about 99 weight percent of the pharmaceutical composition or dosage form.

[00160] Suitable forms of microcrystalline cellulose include, but are not limited to, the materials sold as AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (available from FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), and mixtures thereof. A specific binder is a mixture of microcrystalline cellulose and sodium carboxymethyl cellulose sold as AVICEL RC-581. Suitable anhydrous or low moisture excipients or additives include AVICEL-PH-103™ and Starch 1500 LM.

[00161] Disintegrants are used in the compositions of the invention to provide tablets that disintegrate when exposed to an aqueous environment. Tablets that contain too much disintegrant may disintegrate in storage, while those that contain too little may not disintegrate at a desired rate or under the desired conditions. Thus, a sufficient amount of disintegrant that is neither too much nor too little to detrimentally alter the release of the active ingredients should be used to form solid oral dosage forms of the invention. The amount of disintegrant used varies based upon the type of formulation, and is readily discernible to those of ordinary skill in the art. Typical pharmaceutical compositions comprise from about 0.5 to about 15 weight percent of disintegrant, specifically from about 1 to about 5 weight percent of disintegrant.

[00162] Disintegrants that can be used in pharmaceutical compositions and dosage forms of the invention include, but are not limited to, agar-agar, alginic acid, calcium carbonate, microcrystalline cellulose, croscarmellose sodium, crospovidone, polacrilin potassium, sodium starch glycolate, potato or tapioca starch, pre-gelatinized starch, other starches, clays, other algins, other celluloses, gums, and mixtures thereof.

[00163] Lubricants that can be used in pharmaceutical compositions and dosage forms of the invention include, but are not limited to, calcium stearate, magnesium stearate, mineral oil, light mineral oil, glycerin, sorbitol, mannitol, polyethylene glycol, other glycols, stearic acid, sodium lauryl sulfate, talc, hydrogenated vegetable oil (e.g., peanut

oil, cottonseed oil, sunflower oil, sesame oil, olive oil, corn oil, and soybean oil), zinc stearate, ethyl oleate, ethyl laureate, agar, and mixtures thereof. Additional lubricants include, for example, a syloid silica gel (AEROSIL 200, manufactured by W.R. Grace Co. of Baltimore, MD), a coagulated aerosol of synthetic silica (marketed by Degussa Co. of Plano, TX), CAB-O-SIL (a pyrogenic silicon dioxide product sold by Cabot Co. of Boston, MA), and mixtures thereof. If used at all, lubricants are typically used in an amount of less than about 1 weight percent of the pharmaceutical compositions or dosage forms into which they are incorporated.

Delayed Release Dosage Forms

[00164] Active ingredients of the invention can be administered by controlled release means or by delivery devices that are well known to those of ordinary skill in the art. Examples include, but are not limited to, those described in U.S. Patent Nos.: 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; and 4,008,719, 5,674,533, 5,059,595, 5,591,767, 5,120,548, 5,073,543, 5,639,476, 5,354,556, and 5,733,566, each of which is incorporated herein by reference. Such dosage forms can be used to provide slow or controlled-release of one or more active ingredients using, for example, hydropropylmethyl cellulose, other polymer matrices, gels, permeable membranes, osmotic systems, multilayer coatings, microparticles, liposomes, microspheres, or a combination thereof to provide the desired release profile in varying proportions. Suitable controlled-release formulations known to those of ordinary skill in the art, including those described herein, can be readily selected for use with the active ingredients of the invention. The invention thus encompasses single unit dosage forms suitable for oral administration such as, but not limited to, tablets, capsules, gelcaps, and caplets that are adapted for controlled-release.

[00165] All controlled-release pharmaceutical products have a common goal of improving drug therapy over that achieved by their non-controlled counterparts. Ideally, the use of an optimally designed controlled-release preparation in medical treatment is characterized by a minimum of drug substance being employed to cure or control the condition in a minimum amount of time. Advantages of controlled-release formulations include extended activity of the drug, reduced dosage frequency, and increased patient compliance. In addition, controlled-release formulations can be used to affect the time of onset of action or other characteristics, such as blood levels of the drug, and can thus affect the occurrence of side (e.g., adverse) effects.

[00166] Most controlled-release formulations are designed to initially release an amount of drug (active ingredient) that promptly produces the desired therapeutic effect, and gradually and continually release other amounts of drug to maintain this level of therapeutic or prophylactic effect over an extended period of time. In order to maintain this

constant level of drug in the body, the drug must be released from the dosage form at a rate that will replace the amount of drug being metabolized and excreted from the body. Controlled-release of an active ingredient can be stimulated by various conditions including, but not limited to, pH, temperature, enzymes, water, or other physiological conditions or compounds.

Parenteral Dosage Forms

[00167] Parenteral dosage forms can be administered to patients by various routes including, but not limited to, subcutaneous, intravenous (including bolus injection), intramuscular, and intraarterial. Because their administration typically bypasses patients' natural defenses against contaminants, parenteral dosage forms are preferably sterile or capable of being sterilized prior to administration to a patient. Examples of parenteral dosage forms include, but are not limited to, solutions ready for injection, dry and/or lyophylized products ready to be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable vehicle for injection (reconstitutable powders), suspensions ready for injection, and emulsions.

[00168] Suitable vehicles that can be used to provide parenteral dosage forms of the invention are well known to those skilled in the art. Examples include, but are not limited to: Water for Injection USP; aqueous vehicles such as, but not limited to, Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, and Lactated Ringer's Injection; water-miscible vehicles such as, but not limited to, ethyl alcohol, polyethylene glycol, and polypropylene glycol; and non-aqueous vehicles such as, but not limited to, corn oil, cottonseed oil, peanut oil, sesame oil, ethyl oleate, isopropyl myristate, and benzyl benzoate.

[00169] Compounds that increase the solubility of one or more of the active ingredients disclosed herein can also be incorporated into the parenteral dosage forms of the invention.

Transdermal Dosage Forms

[00170] Transdermal dosage forms include "reservoir type" or "matrix type" patches, which can be applied to the skin and worn for a specific period of time to permit the penetration of a desired amount of active ingredients.

[00171] Suitable excipients (e.g., carriers and diluents) and other materials that can be used to provide transdermal and topical dosage forms encompassed by this invention are well known to those skilled in the pharmaceutical arts, and depend on the particular tissue to which a given pharmaceutical composition or dosage form will be applied. With that fact in mind, typical excipients include, but are not limited to, water, acetone, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, butane-1,3-diol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, mineral oil, and mixtures thereof.

[00172] Depending on the specific tissue to be treated, additional components may be used prior to, in conjunction with, or subsequent to treatment with active ingredients of the invention. For example, penetration enhancers can be used to assist in delivering the active ingredients to the tissue. Suitable penetration enhancers include, but are not limited to: acetone; various alcohols such as ethanol, oleyl, and tetrahydrofuryl; alkyl sulfoxides such as dimethyl sulfoxide; dimethyl acetamide; dimethyl formamide; polyethylene glycol; pyrrolidones such as polyvinylpyrrolidone; Kollidon grades (Povidone, Polyvidone); urea; and various water-soluble or insoluble sugar esters such as Tween 80 (polysorbate 80) and Span 60 (sorbitan monostearate).

[00173] The pH of a pharmaceutical composition or dosage form, or of the tissue to which the pharmaceutical composition or dosage form is applied, may also be adjusted to improve delivery of one or more active ingredients. Similarly, the polarity of a solvent carrier, its ionic strength, or tonicity can be adjusted to improve delivery. Compounds such as stearates can also be added to pharmaceutical compositions or dosage forms to advantageously alter the hydrophilicity or lipophilicity of one or more active ingredients so as to improve delivery. In this regard, stearates can serve as a lipid vehicle for the formulation, as an emulsifying agent or surfactant, and as a delivery-enhancing or penetration-enhancing agent. Different salts, hydrates or solvates of the active ingredients can be used to further adjust the properties of the resulting composition.

Topical Dosage Forms

[00174] Topical dosage forms of the invention include, but are not limited to, creams, lotions, ointments, gels, solutions, emulsions, suspensions, or other forms known to one of skill in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990); and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1985).

[00175] Suitable excipients (e.g., carriers and diluents) and other materials that can be used to provide transdermal and topical dosage forms encompassed by this invention are well known to those skilled in the pharmaceutical arts, and depend on the particular tissue to which a given pharmaceutical composition or dosage form will be applied. With that fact in mind, typical excipients include, but are not limited to, water, acetone, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, butane-1,3-diol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, mineral oil, and mixtures thereof.

[00176] Depending on the specific tissue to be treated, additional components may be used prior to, in conjunction with, or subsequent to treatment with active ingredients of the invention. For example, penetration enhancers can be used to assist in delivering the active ingredients to the tissue. Suitable penetration enhancers include, but are not limited to: acetone; various alcohols such as ethanol, oleyl, and tetrahydrofuryl; alkyl sulfoxides such as dimethyl sulfoxide; dimethyl acetamide; dimethyl formamide; polyethylene glycol; pyrrolidones such as polyvinylpyrrolidone; Kollidon grades (Povidone, Polyvidone); urea; and various water-soluble or insoluble sugar esters such as Tween 80 (polysorbate 80) and Span 60 (sorbitan monostearate).

Mucosal Dosage Forms

[00177] Mucosal dosage forms of the invention include, but are not limited to, ophthalmic solutions, sprays and aerosols, or other forms known to one of skill in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990); and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1985). Dosage forms suitable for treating mucosal tissues within the oral cavity can be formulated as mouthwashes or as oral gels. In one embodiment, the aerosol comprises a carrier. In another embodiment, the aerosol is carrier free.

[00178] The TLR7 ligands or TLR7 ligand prodrugs of the invention may also be administered directly to the lung by inhalation. For administration by inhalation, a TLR7 ligand can be conveniently delivered to the lung by a number of different devices. For example, a Metered Dose Inhaler ("MDI") which utilizes canisters that contain a suitable low boiling propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas can be used to deliver a TLR7 ligand directly to the lung. MDI devices are available from a number of suppliers such as 3M Corporation, Aventis, Boehringer Ingleheim, Forest Laboratories, Glaxo-Wellcome, Schering Plough and Vectura.

[00179] Alternatively, a Dry Powder Inhaler (DPI) device can be used to administer a TLR7 ligand to the lung (see, e.g., Raleigh *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Research Annual Meeting, 1999, 40, 397, which is herein incorporated by reference). DPI devices

typically use a mechanism such as a burst of gas to create a cloud of dry powder inside a container, which can then be inhaled by the patient. DPI devices are also well known in the art and can be purchased from a number of vendors which include, for example, Fisons, Glaxo-Wellcome, Inhale Therapeutic Systems, ML Laboratories, Qdose and Vectura. A popular variation is the multiple dose DPI ("MDDPI") system, which allows for the delivery of more than one therapeutic dose. MDDPI devices are available from companies such as AstraZeneca, GlaxoWellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma and Vectura. For example, capsules and cartridges of gelatin for use in an inhaler or insufflator can be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch for these systems.

[00180] Another type of device that can be used to deliver a TLR7 ligand or TLR7 ligand prodrug to the lung is a liquid spray device supplied, for example, by Aradigm Corporation. Liquid spray systems use extremely small nozzle holes to aerosolize liquid drug formulations that can then be directly inhaled into the lung.

[00181] In a preferred embodiment, a nebulizer device is used to deliver TLR7 ligands or TLR ligand prodrugs to the lung. Nebulizers create aerosols from liquid drug formulations by using, for example, ultrasonic energy to form fine particles that can be readily inhaled (See e.g., Verschoyle *et al.*, British J. Cancer, 1999, 80, Suppl 2, 96, which is herein incorporated by reference). Examples of nebulizers include devices supplied by Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd, Aventis, and Batelle Pulmonary Therapeutics. See U.S. Pat. Nos. 5,954,047; 5,950,619; 5,970,974, which are herein incorporated by reference.

[00182] In a particularly preferred embodiment, an electrohydrodynamic ("EHD") aerosol device is used to deliver TLR7 ligands and TLR7 ligand prodrugs to the lung. EHD aerosol devices use electrical energy to aerosolize liquid drug solutions or suspensions (see, e.g., Noakes *et al.*, U.S. Pat. No. 4,765,539; Coffee, U.S. Pat. No., 4,962,885; Coffee, PCT Application, WO 94/12285; Coffee, PCT Application, WO 94/14543; Coffee, PCT Application, WO 95/26234, Coffee, PCT Application, WO 95/26235, Coffee, PCT Application, WO 95/32807, which are herein incorporated by reference). The electrochemical properties of the TLR7 ligands and TLR7 ligand prodrugs formulation may be important parameters to optimize when delivering this drug to the lung with an EHD aerosol device and such optimization is routinely performed by one of skill in the art. EHD aerosol devices may more efficiently delivery drugs to the lung than existing pulmonary delivery technologies. Other methods of intra-pulmonary delivery of TLR7 ligand and TLR7 ligand prodrugs will be known to the skilled artisan and are within the scope of the invention.

[00183] Liquid drug formulations suitable for use with nebulizers and liquid spray devices and EHD aerosol devices will typically include a TLR7 ligand or TLR7 ligand prodrug with a pharmaceutically acceptable carrier. Preferably, the pharmaceutically acceptable carrier is a liquid such as alcohol, water, polyethylene glycol or a perfluorocarbon. Optionally, another material may be added to alter the aerosol properties of the solution or suspension of the TLR7 ligand or prodrug of a TLR7 ligand. Preferably, this material is liquid such as an alcohol, glycol, polyglycol or a fatty acid. Other methods of formulating liquid drug solutions or suspension suitable for use in aerosol devices are known to those of skill in the art (see, e.g., Biesalski, U.S. Pat. Nos. 5,112,598; Biesalski, 5,556,611, which are herein incorporated by reference) A TLR7 ligand or prodrug of a TLR7 ligand can also be formulated in rectal or vaginal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

[00184] In addition to the formulations described previously, a TLR7 ligand or TLR7 ligand prodrug can also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations can be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds can be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

[00185] Alternatively, other pharmaceutical delivery systems can be employed. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles that can be used to deliver TLR7 ligands and TLR7 ligand prodrugs. Certain organic solvents such as dimethylsulfoxide can also be employed, although usually at the cost of greater toxicity. A TLR7 ligand or prodrug of a TLR7 ligand can also be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump can be used (Sefton, CRC Crit. Ref Biomed Eng., 1987, 14, 201; Buchwald *et al.*, Surgery, 1980, 88, 507; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med., 1989, 321, 574). In another embodiment, polymeric materials can be used (see Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 1983, 23, 61; see also Levy *et al.*, Science, 1985, 228, 190; During *et al.*, Ann. Neurol., 1989,25,351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71, 105). In yet another embodiment, a controlled-release system can be placed in proximity of the target of the compounds of the invention, e.g., the lung, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, e.g., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp.

115 (1984)). Other controlled-release system can be used (see, e.g. Langer, Science, 1990, 249, 1527).

[00186] Suitable excipients (e.g., carriers and diluents) and other materials that can be used to provide mucosal dosage forms encompassed by this invention are well known to those skilled in the pharmaceutical arts, and depend on the particular site or method which a given pharmaceutical composition or dosage form will be administered. With that fact in mind, typical excipients include, but are not limited to, water, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, butane-1,3-diol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, mineral oil, and mixtures thereof, which are non-toxic and pharmaceutically acceptable. Examples of such additional ingredients are well known in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990).

[00187] The pH of a pharmaceutical composition or dosage form, or of the tissue to which the pharmaceutical composition or dosage form is applied, can also be adjusted to improve delivery of one or more active ingredients. Similarly, the polarity of a solvent carrier, its ionic strength, or tonicity can be adjusted to improve delivery. Compounds such as stearates can also be added to pharmaceutical compositions or dosage forms to advantageously alter the hydrophilicity or lipophilicity of one or more active ingredients so as to improve delivery. In this regard, stearates can serve as a lipid vehicle for the formulation, as an emulsifying agent or surfactant, and as a delivery-enhancing or penetration-enhancing agent. Different salts, hydrates or solvates of the active ingredients can be used to further adjust the properties of the resulting composition.

KITS

[00188] The invention provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers comprising a TLR7 ligand prodrug useful for the treatment or prevention of a Hepatitis C virus infection. In other embodiments, the invention provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers comprising a TLR7 ligand prodrug useful for the treatment or prevention of a Hepatitis C virus infection and one or more containers comprising an additional therapeutic agent, including but not limited to those listed in section 5.2.2 above, in particular an antiviral agent, an interferon, an agent which inhibits viral enzymes, or an agent which inhibits viral replication, preferably the additional therapeutic agent is HCV specific or demonstrates anti-HCV activity.

[00189] The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers comprising one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of

manufacture, use or sale for human administration.

ASSAYS

[00190] The TLR7 ligands, TLR ligand prodrugs, compositions and dosage forms of the invention can be tested *in vitro* or *in vivo* by a variety of methods known in the art to test activity. See, for example, the methods discussed below and used throughout the examples.

[00191] A range of assays for the purpose of evaluating TLR7 activity are available, and are described in the following publications, each of which is incorporated-by-reference: Hirota *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45, 5419-5422 (2002); and Akira S. *et al.*, *Immunology Letters*, 85, 85-95 (2003). For example, one system useful for the assay of TLR7 ligands is where the gene for TLR7 is cloned by methods known to those of skill in the art and transfected into an appropriate cell type such that TLR7 is expressed and coupled to a NFkB-luciferase reporter plasmid. In this cell system, exposure to TLR7 ligand prodrugs in cell culture results in a measurable luminescence signal. See, e.g., Lee *et al.*, *Proc. Nat. Acad. USA*, 100, 6646-6651 (2003); Hemmi *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3, 196-200 (2002); and Jurk *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3, 499 (2002) (wherein the Lee *et al.*, Hemmi *et al.*, and Jurk *et al.*, references are all incorporated herein by reference).

[00192] Another example of an in vitro method is to expose human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to the candidate TLR7 ligand prodrug for a predetermined interval (e.g., 2 hours to 24 hours), followed by measurement of immunologic activity. Such immunologic activity may include induction of the synthesis of cytokines, which can be measured in the culture supernate by ELISA assay of the cytokine protein, such as a Type 1 interferon (interferon alpha, interferon beta) or Type 2 interferon (interferon gamma). Alternatively, the PBMC can be harvested after incubation with the candidate TLR7 ligand prodrug, the PBMC RNA extracted, and the level of induction of immune system genes determined by RNAse protection assays of the extracted RNA. Genes typically induced include 2'5'-OAS, or interferon gamma, but a range of cytokines can be measured. See, e.g., Hirota *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5419-5422 (2002).

[00193] RNAse protection assays (RPA) are a method known in the art wherein RNA analytes are quantitated by first hybridizing them to a radioalabeled RNA sequence specific for the analyte RNA, followed by digestion with enzymes that selectively degrade single stranded RNA. The sample is then submitted to gel electrophoresis under conditions that resolve the hybridized, protected double stranded RNA. The gel is then autoradiographed to reveal the location and intensity of the bands. These can be quantitated by methods well known in the art. Multiple analyte RNA species can be simultaneously assayed, if the protected fragments are sufficiently different in size to allow

their separation by gel electrophoresis. Comparison of the levels of an analyte RNA to control RNA species that is expressed at constant levels in cells provides an internal control that enable changes in levels of the analyte RNA species to be monitored even if the total amount of RNA varies. Such RNAse protection assays can be performed as follows:

[00194] RNA is purified from PMBC pellets using the "RNAeasy" kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Template sets may be obtained from PharMingen (BD Biosciences); a useful set that is commercially available from this supplier contains materials allowing the assay of TNF-a, IL12 p35, IP10, IL-1a, IL-1b, IL-6, Interferon gamma, and the control RNA species L32 and GAPDH. This template set contains DNA that is appropriate for synthesis of the proper RNA probe for each of the listed genes.

[00195] Probe synthesis is performed using the PharMingen in vitro transcription kit provided in the kit. The reaction contains RNase inhibitor; transcription buffer; 50 ng of the tempate set; 0.1375 mM of each of rGTP, rCTP, rATP; 0.003 mM rUTP;10 mM DTT, 0.010 mCi of [alpha 32P] UTP, and 20 Units of T7 RNA polymerase in a volume of 20 microliters. The reaction mixture is incubated for one hour at 37 °C, and then stopped by addition of 2 units of RNAse free DNAse, with an additional incubation of 30 minutes at 37 °C. The RNA probes synthesized in this incubation are extracted once with 5.2 mM EDTA, 25 μl of Tris Saturated phenol, 25 μL of chloroform, and 4 μg of yeast tRNA, and then extracted with 50 μL of chloroform. The RNA is precipitated by addition of 50 μL of 4M ammonium acetate and 250 μL of ice-cold 100% ethanol, and after incubation at –80 °C for 30 minutes the preparation is centrifuged at high speed for 30 minutes. The pellet is washed in 100 % ethanol, and after removal of the ethanol the probe is resuspended and used in the RNAse protection incubation.

[00196] The RNAse protection assay uses the probe material prepared above and RNA extracted from PBMC. The PBMC RNA is washed in 100% ethanol, quantitated by absorbance at 260 nm. The RPA is performed as described in the protocol provided in the PharMingen RiboQuant kit. Eight μL of the PBMC RNA samples are mixed with the 2 μL of the probe set in a thin-walled PCR tube, mixed well, briefly centrifuged and then overlaid with mineral oil. The tube is then placed in a 90 °C PCR block, cooled to 56 °C, and incubated for 16 hours. The samples are then cooled to 37 °C and RNAse A and RNAse T1 are added. The mixture is incubated for 45 minutes at 30 °C, and the reaction stopped with a mix of protease K and yeast tRNA. The RNA is extracted with phenol-chloroform, and then precipitated from the phenol-chloroform with ammonium acetate-ethanol. The pellet is washed with ethanol and resuspended in buffer for electrophoresis.

The samples are analysed by gel electrophoresis by methods well known in molecular biology.

[00197] A number of assays may be employed in accordance with the present invention in order to determine the degree of anti-viral activity of a compound of the invention such as cell culture, animal models, and administration to human subjects. The assays described herein may be used to assay viral growth over time to determine the growth characteristics of a virus in the presence of a compound of the invention.

[00198] In another embodiment, a virus and a compound of the invention are administered to animal subjects susceptible to infection with the virus. The incidence, severity, length, virus load, mortality rate of infection, etc. can be compared to the incidence, severity, length, virus load, mortality rate of infection, etc. observed when subjects are administered the virus alone (in the absence of a compound of the invention). Anti-virus activity of the compound of the invention is demonstrated by a decrease in incidence, severity, length, virus load, mortality rate of infection, etc. in the presence of the compound of the invention. In a specific embodiment, the virus and the compound of the invention are administered to the animal subject at the same time. In another specific embodiment, the virus is administered to the animal subject before the compound of the invention. In another specific embodiment, the compound of the invention is administered to the animal subject before the virus.

[00199] In another embodiment, the growth rate of the virus can be tested by sampling biological fluids/clinical samples (e.g., nasal aspirate, throat swab, sputum, broncho-alveolar lavage, urine, saliva, blood, or serum) from human or animal subjects at multiple time points post-infection either in the presence or absence of a compound of the invention and measuring levels of virus. In specific embodiments, the growth rate of a virus is assayed by assessing the presence of virus in a sample after growth in cell culture, growth on a permissible growth medium, or growth in subject using any method well-known in the art, for example, but not limited to, immunoassay (*e.g.*, ELISA; for discussion regarding ELISAs *see, e.g.*, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1), immunofluorescent staining, or immunoblot analysis using an antibody which immunospecifically recognizes the virus to be assayed or detection of a virus-specific nucleic acid (*e.g.*, by Southern blot or RT-PCR analysis, etc.).

[00200] In a specific embodiment, viral titers can be determined by obtaining biological fluids/clinical samples from infected cells or an infected subject, preparing a serial dilution of the sample and infecting a monolayer of cells that are susceptible to infection with the virus (e.g. primary cells, transformed cell lines, patient tissue samples,

etc) at a dilution of the virus that allows for the emergence of single plaques. The plaques can then be counted and the viral titer expressed as plaque forming units per milliliter of sample.

[00201] In one specific embodiment, the growth rate of a virus in a subject can be estimated by the titer of antibodies against the virus in the subject. Antibody serum titer can be determined by any method well-known in the art, for example, but not limited to, the amount of antibody or antibody fragment in serum samples can be quantitated by, e.g., ELISA.

[00202] Additionally, *in vivo* activity of a TLR7 ligand or prodrug of a TLR7 ligand can be determined by directly administering the compound to a test animal, collecting biological fluids (e.g., nasal aspirate, throat swab, sputum, broncho-alveolar lavage, urine, saliva, blood, or serum) and testing the fluid for anti-virus activity.

[00203] In embodiments where samples to be assayed for virus levels are biological fluids/clinical samples (e.g., nasal aspirate, throat swab, sputum, broncho-alveolar lavage, urine, saliva, blood, or serum), the samples may or may not contain in tact cells. Samples from subjects containing intact cells can be directly processed, whereas isolates without intact cells may or may not be first cultured on a permissive cell line (e.g. primary cells, transformed cell lines, patient tissue samples, etc) or growth medium (e.g., LB broth/agar, YT broth/agar, blood agar, etc.). Cell suspensions can be cleared by centrifugation at, e.g., 300xg for 5 minutes at room temperature, followed by a PBS, pH 7.4 (Ca++ and Mg++ free) wash under the same conditions. Cell pellets can be resuspended in a small volume of PBS for analysis. Primary clinical isolates containing intact cells can be mixed with PBS and centrifuged at 300xg for 5 minutes at room temperature. Mucus is removed from the interface with a sterile pipette tip and cell pellets can be washed once more with PBS under the same conditions. Pellets can then be resuspended in a small volume of PBS for analysis.

[00204] In another embodiment, a compound of the invention is administered to a human subject infected with a virus. The incidence, severity, length, viral load, mortality rate of infection, etc. can be compared to the incidence, severity, length, viral load, mortality rate of infection, etc. observed in human subjects infected with a virus in the absence of a compound of the invention or in the presence of a placebo. Anti-viral activity of the compound of the invention is demonstrated by a decrease in incidence, severity, length, viral load, mortality rate of infection, etc. in the presence of the compound of the invention. Any method known in the art can be used to determine anti-viral activity in a subject such as those described previously.

[00205] Additionally, *in vivo* activity of a TLR7 ligand or prodrug of TLR7 ligand can be determined by directly administering the compound to an animal or human subject, collecting biological fluids/clinical samples (e.g., nasal aspirate, throat swab, sputum, broncho-alveolar lavage, urine, saliva, blood, or serum) and testing the biological fluids/clinical samples for anti-viral activity (e.g., by addition to cells in culture in the presence of the virus).

[00206] The foregoing has demonstrated the pertinent and important features of the present invention. One of skill in the art will be appreciate that numerous modifications and embodiments may be devised. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such modifications and embodiments.

6. EXAMPLES

[00207] The following examples are for the purpose of illustration only and are not intended as limiting the scope of the invention.

6.1 TLR7 Ligand Identification

[00208] There are three known chemical classes of TLR7 ligands: guanosines, imidazoquinolines, and pyrimidines (see Section 5.2). As described above, additional TLR7 ligands are readily identified by known screening methods. For example, adenine analogs and derivatives were identified as TLR ligands by using the following screening procedure. See Tables 1 and 2.

A stable HEK293-hTLR7 cell line was obtained from Invivogen (San Diego, California), transfected with pNiFty2-Luc, an NF-kB inducible luciferase reporter plasmid (Invivogen) and (dual) stable transfectants selected. The resultant dual (hTLR7/pNiFty2-Luc) cell lines were functionally tested by response to loxoribine and isatoribine as measured by fold luciferase induction relative to a no drug control. The C23 line was chosen due to its satisfactory response and sensitivity profile with these (and other) TLR7 agonists. The biological rationale which connects TLR7 engagement and NF-kB activation has met with widespread acceptance (for a review, see Akira S. *et al.*, *Immunol. Lett.*, 85, 85-95 (2003))

and as a consequence the HEK293-TLR-NF-kB inducible reporter system is accepted as a standard assay which has been consistently used to assay TLR(7) agonists, in either transient or stable system format. See, e.g., Hemmi H. *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3, 196-200 (2002); Jurk M. *et al.*, *Nat. Immunol.*, 3, 499 (2002); and Lee J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 100, 6646-51 (2003).

[00209] For a typical C23 assay, cells are seeded at $6x10^4$ cells/well in 96 well plates and 4-24 hours later are treated with various concentrations of compound. After 2-48 hours exposure the cell monolayers are lyzed with passive lysis buffer (Promega) and the firefly

luciferase assay carried out using the luciferase assay reagent (Promega) as specified by the manufacturer. Relative luciferase activities are expressed as folds of induction compared to the no drug control. A two-fold induction over background is considered a *bona fide* TLR7 agonist, dependent on this being a statistically significant increase.

Table 1: Isatoribine Activates Human TLR7 in HEK293 Assay

Compound No.	Compound concentration, μM			
	50	100	250	500
21	3.1 (± 0.2)	3.4 (± 0.1)	6.2 (± 0.5)	10.9 (± 0.7)

Table 2: Adenine Derivative Activates Human TLR7 in HEK293 Assay

Compound No.	Compound concentration, μM			
	1.0	3.2	10	32
29	20.8 (± 1.1)	37.3 (± 0.5)	47.5 (± 0.2)	48.4 (± 0.4)

[00210] In Table 1, isatoribine, was added to C23 cells for forty-eight hours, and the cells were then harvested and assayed for luciferase activity. Each time-point was assayed in triplicate. The data displayed is the mean fold induction compared to the no drug control, together with the standard deviation in parentheses.

[00211] In Table 2, an adenine derivative 29 was added to C23 cells for twenty-four hours, and the cells were then harvested and assayed for luciferase activity. Each time-point was assayed in triplicate. The data displayed is the mean fold induction compared to the no drug control, together with the standard deviation in parentheses.

6.2 TLR7 Ligands Tested as anti-HCV Agents

HCV Viral Load Reduction

[00212] Isatoribine investigational drug product was supplied as a 1 mg/mL solution in sterile normal saline contained in a 50 mL vial. Isatoribine was administered in humans by intravenous infusion once daily for 7 days, at 200, 400, 600 or 800 mg per dose. All doses were administered by constant rate infusion over a 60-minute period, except the 800 mg dose was administered over an 80-minute period. The flow rate for each dose was as

follows: 3.33 mL/min for the 200 mg dose; 6.67 mL/min for the 400 mg dose; 8.33 mL/min for the 500 mg dose; or 10.0 mL/min for the 600 mg and 800 mg dose.

[00213] Four to twelve patients were enrolled in each of the dose groups (200 mg, 400 mg, 600 mg and 800 mg per dose) and received once daily intravenous infusions for 7 days. Prior to dosing, a blood sample was drawn from each patient for assessment of the genotype of the HCV virus.

[00214] Plasma HCV RNA was determined at baseline (an average of 2 pre-treatment measurements taken on Day –1 or pre-treatment and on Day 1) and once daily prior to the start of the first daily isatoribine intravenous infusion on Days 2 through 7 for these daily (x7 days) dosing groups. See Figure 2. The viral load was measured by the branched DNA method (Versant™ v3.0 bDNA assay, Bayer Diagnostics). For plasma HCV RNA, the maximum change from the pre-treatment baseline was estimated using log-transformed values.

[00215] Plasma HCV RNA decreased over the course of isatoribine treatment, with the larger changes generally occurring in patients who received the higher daily doses (Figure 2). Eight of 12 patients who received isatoribine 800 mg QD x 7 days showed a plasma viral load decrease of more than 0.5 log10 units, with a mean change in these 12 patients of -0.76 log10 units and range of –2.85 to +0.21 log10 units. This decrease in viral load was statistically significant for the 800 mg QD dose group (p=0.008). Plasma viral load declines generally reversed upon cessation of treatment.

HCV Replicon-Based Viral Bioassay

[00216] It has been demonstrated that HCV replicons are highly sensitive to the inhibitory effects of interferon-α and interferon-γ. Therefore the HCV replicon becomes a very useful system for measuring the amount of biologically active interferons in supernatants from human PBMCs stimulated with a TLR7 agonist. A quantitative assay was developed which is based on measuring the activity of the luciferase reporter gene that was integrated into an HCV replicon. By using this system, interferons from TLR7 agonist-treated PBMCs were measured and their inhibitory activity was assessed using the luciferase reporter replicon.

[00217] Human PBMCs isolated from a healthy donor were placed in replicate cell culture wells (5×10^6 cells per well). The PBMCs are incubated in the absence of test compounds at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 24 hours to allow stabilization to the culture conditions, and then the TLR7 ligand or a drug free control is added to replicate wells containing PBMCs from the same donor. The concentrations of TLR7 ligand may be varied to suit the particular experiment, and the PBMC cultures are then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for eight hours.

Samples of cell culture supernatant are taken at the eight hour time point (or twenty four hour time point in case of Loxoribine and its prodrugs) from TLR7 ligand treated and control wells and are assayed for interferon-alpha production by ELISA. Supernatants from compound-treated cells and a no-drug control were diluted at 1:10, 1:100, and 1:1000 in RPMI media and applied to a 96-well plate of Huh7 hepatocyte cells containing the luciferase reporter replicon. Cells were incubated for 48 hours at 37 °C in a tissue culture incubator.

[00218] After the incubation period, the 96-well plates are washed 2X with PBS and are lysed with passive lysis buffer (Promega). Plates are shaken at room temperature for 20 minutes and standard luciferase assay reagent (Promega) is added to each well by injection and the plate is read on an Lmax luminometer (Molecular Devices). The raw relative light units are converted to a percent inhibition that is compared to the no-drug control wells to determine the level of inhibition observed in the replicon assay. The estimated maximal concentration of interferons required to inhibit HCV replicon replication was determined to be at a 1:10 dilution of supernatant of PBMC-stimulated cells which fell within our test range of the dilution series. For all TLR7 agonists tested, 100% inhibition was observed on the luciferase reporter replicon system at the 1:10 dilution.

[00219] The data presented in Tables 3-8 represents the inhibition of the HCV replicon system by the supernatant collected after exposure of PBMC cells to the compound at an initial concentration for the incubation time indicated and diluted as specified in the first column ("PBMC exposed to compound"). A supernatant collected from PBMC cells non-exposed to the compound and diluted as specified in the first column was used as a control ("Blank supernatant"). The PBMC cells were isolated from a single blood donor as specified.

Table 3: Antiviral Effect of Isatoribine in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL72035

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:100	0	100
1:1000	0	94

No. 2
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL75287

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound

1:10	0	100
1:100	0	87
1:1000	0	6

No. 3
Incubation time: 24 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL75864

	HCV replicon inhibition, %	
Dilution of supernatant	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	23	99
1:1000	0	64

Table 4: Antiviral Effect of Loxoribine in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1
Incubation time : 24 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL75864

	HCV replicon inhibition, %	
Dilution of supernatant	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	23	74
1:1000	0	17

Table 5: Antiviral Effect of Imiquimod in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 3.2 μM
Blood donor number: FL75287

	HCV replicon inhibition, %	
Dilution of supernatant	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	0	100
1:1000	0	89

No. 2
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 3.2 μM
Blood donor number: FL75287

	HCV replicon inhibition, %	
Dilution of supernatant	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	3	100
1:100	13	75
1:1000	3	1

Table 6: Antiviral Effect of Resiquimod in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1

Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 10 μM
Blood donor number: FL75287

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	0	98
1:1000	0	21

No. 2
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 10 μM
Blood donor number: FL75287

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	3	100
1:100	13	88
1:1000	3	6

Table 7: Antiviral Effect of Bropirimine in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL72035

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	0	95
1:1000	0	0

No. 2
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 100 μM
Blood donor number: FL72036

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	8	95
1:1000	0	33

Table 8: Antiviral Effect of Adenine Derivative in the *in vitro* HCV Replicon Bioassay

No. 1
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 0.1 μM
Blood donor number: FL76418
Form of the compound: a TFA salt

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100

1:100	3	73
1:1000	3	0

No. 2
Incubation time: 8 hours
Initial concentration: 0.1 μM
Blood donor number: FL76418
Form of the compound: a TFA salt

Dilution of supernatant	HCV replicon inhibition, %	
	Blank PBMC	PBMC exposed to compound
1:10	0	100
1:100	3	64
1:1000	3	9

6.3 Preparation of TLR7 Ligand Prodrugs

[00220] Compounds of the invention can be synthesized using the methodology described in Schemes 1-18 above. Unless otherwise indicated all temperatures are set forth in degrees Celsius and all parts and percentages are by weight. Reagents are purchased from commercial suppliers such as Aldrich Chemical Company or Lancaster Synthesis Ltd. and are used without further purification unless otherwise indicated. Tetrahydrofuran (THF) and N,N-dimethylforamide (DMF) are purchased from Aldrich in Sure Seal bottles and used as received. Unless otherwise indicated, the following solvents and reagents are distilled under a blanket of dry nitrogen. THF and Et_2O are distilled from Na-benzophenone ketyl; CH_2Cl_2 (DCM), diisopropylamine, pyridine and Et_3N are distilled from CaH_2; MeCN is distilled first from P_2O_5, then from CaH_2; MeOH is distilled from Mg; PhMe, EtOAc and i-PrOAc are distilled from CaH_2; TFAA was purified via simple atmospheric distillation under dry argon.

The reactions set forth are done generally under a positive pressure of argon at an ambient temperature (unless otherwise stated) in anhydrous solvents, and the reaction flasks are fitted with rubber septa for the introduction of substrates and reagents via syringe. Glassware is oven dried and/or heat dried. The reactions are assayed by TLC and terminated as judged by the consumption of starting material. Analytical thin layer chromatography (TLC) is performed on aluminum-backed silica gel 60 F254 0.2 mm plates (EM Science), and visualized with UV light (254 nm) followed by heating with commercial ethanolic phosphomolybdic acid. Preparative thin layer chromatography (TLC) is performed on aluminum-backed silica gel 60 F254 1.0 mm plates (EM Science) and visualized with UV light (254 nm). HPLC is performed on a Waters Micromass ZQ system consisting of a model 2525 binary gradient pump with an Alltech model 800 ELSD detector and a Waters model 996 photodiode array detector.

[00221] Work-ups are typically done by doubling the reaction volume with the reaction solvent or extraction solvent and then washing with the indicated aqueous

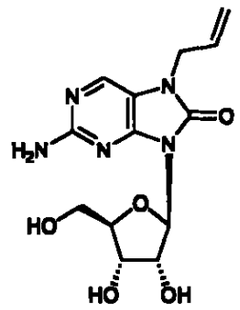
solutions using 25% by volume of the extraction volume unless otherwise indicated. Product solutions are dried over anhydrous Na_2SO_4 and/or Mg_2SO_4 prior to filtration and evaporation of the solvents under reduced pressure on a rotary evaporator and noted as solvents removed in vacuo. Column chromatography is completed under positive pressure using 230-400 mesh silica gel or 50-200 mesh neutral alumina. Hydrogenolysis is done at the pressure indicated in the examples or at ambient pressure.

[00222] ^{1}H-NMR spectra is recorded on a Varian Mercury-VX400 instrument operating at 400 MHz and ^{13}C-NMR spectra are recorded operating at 75 MHz. NMR spectra are obtained as $CDCl_3$ solutions (reported in ppm), using chloroform as the reference standard (7.27 ppm and 77.00 ppm), CD_3OD (3.4 and 4.8 ppm and 49.3 ppm), DMSO-d_6, or internally tetramethylsilane (0.00 ppm) when appropriate. Other NMR solvents are used as needed. When peak multiplicities are reported, the following abbreviations are used: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broadened), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets). Coupling constants, when given, are reported in Hertz (Hz).

[00223] Infrared (IR) spectra are recorded on a Thermo Nicolet Avatar 370 FT-IR as neat oils or solids, and when given are reported in wave numbers (cm^{-1}). Mass spectra reported (+)-ES Thermo Finnegan LCQ LC/MS conducted by the Analytical Chemistry Department at Anadys Pharmaceuticals, Inc. Elemental analyses are conducted by the Atlantic Microlab, Inc. in Norcross, GA or by NuMega, in San Diego, CA. Melting points (mp) are determined on an open capillary apparatus, and are uncorrected.

[00224] The described synthetic pathways and experimental procedures utilize many common chemical abbreviations, THF (tetrahydrofuran), DMF (N,N-dimethylformamide), EtOAc (ethyl acetate), DMSO (dimethyl sulfoxide), DMAP (4-dimethylaminopyridine), DBU (1,8-diazacyclo[5.4.0]undec-7-ene), DCM (4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylamino-styryl)-4-H–pyran), MCPBA (3-chloroperoxybenzoic acid), EDC (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride), HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), HOBT (1-hydroxybenzotriazole hydrate), TFAA (trifluoroacetic anhydride), pyBOP (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), DIEA (diisopropylethylamine), and the like.

Example 1: **7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one (43)**



Step 1: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1H-purine-6,8-dione (40)

[00225] A heterogeneous mixture of 7-allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-1*H*-purine-6,8-dione 17 (1.00 g, 2.95 mmol, prepared according to Reitz *et al.*, *JMC*, 37, 3561-3578 (1994)), DMAP (0.036 mg, 0.29 mmol) and NEt_3 (2.05 mL, 14.74 mmol) was stirred in dry acetonitrile (25 mL). Acetic anhydride (0.862 mL, 9.13 mmol) was added slowly to the suspension and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The solvent was removed under vacuum and the residue dissolved in dichloromethane (DCM). The organic phase was then washed with saturated aqueous sodium bicarbonate ($NaHCO_3$), brine and thereafter dried with anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$). The solvent was concentrated under vacuum and dried at room temperature under high vacuum to give 1.33 g of 40 (97%) as a pale yellow solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.12 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.39 (br s, 2H), 5.21 (m, 2H), 4.58 (br s, 2H), 4.51 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 466.2 *m/z*.

Step 2: Preparation of 7-Allyl-2-amino-6-chloro-9-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-purin-8-one (41)

[00226] Compound 40 (0.65 g, 1.39 mmol) was dissolved in phosphorus oxychloride (10 mL) and heated to 75 °C for 16 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum and the crude product dissolved in DCM. The mixture was then washed with $NaHCO_3$ solution, brine, dried (MgSO4) and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by flash chromatography using 10 to 50% gradient of ethyl acetate in hexanes. Removal of the solvent afforded 280 mg (41%) of the desired product 41: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.04 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.86 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.18 (m, 4H), 4.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.45 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.31 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 484.2 *m/z*.

Step 3: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-purin-8-one (42)

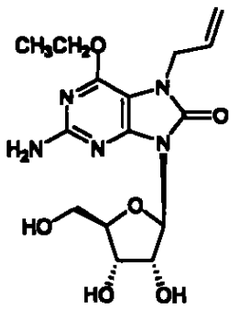
[00227] Compound 41 (0.27 g, 0.56 mmol) was dissolved in acetic acid and Zn-Cu couple was added to the solution. The mixture was heated at 70 °C for 18 h. The suspended

particles were filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography using 10% to 100% gradient of ethyl acetate in hexanes. The solvent was removed to give 150 mg (60 %) of **42** as off-white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.05 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.87 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.83 (m, 1H), 5.48 (br s, 2H), 5.33 (s, 1H), 5.29 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.27 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 450.0 *m/z*.

Step 4: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one (43)

[00228] To a solution of **42** (0.13 g, 0.29 mmol) in methanol (4 mL) was added solid K_2CO_3 (0.024g, 0.17 mmol) and the reaction stirred at ambient temperature for 18 h. To the cloudy mixture was added Amberlite CG-50 (0.5 g) and stirred till neutral and filtered. The filtrate was concentrated to give an off-white solid, which was washed with water and dried under high vacuum to give 93.5 mg of pure **43** in quantitative yield as an off white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.88 (s, 1H), 6.33 (br s, 2H), 5.85 (m, 1H), 5.66 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.89 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.75 (br s, 1H), 4.35 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 8.4 Hz, 1) 3.80 (q, J = 3.6 Hz, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.44 (m, 1H). MS (+)-ES $[M+H]^+$ 324.1 *m/z*.

Example 2: **7-Allyl-2-amino-6-ethoxy-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one (45)**



Step 1: Preparation of 7-Allyl-2-amino-6-ethoxy-9-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-purin-8-one (44)

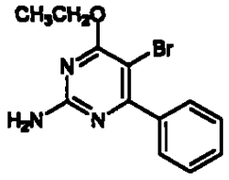
[00229] To a solution of **40** (0.30 g, 0.64 mmol) in dry THF (15 mL) was added polymer-supported triphenylphosphine (0.89 g, 1.93 mmol) and EtOH (0.11 mL, 1.93 mmol) at room temperature. To the stirring mixture was added diethyl azodicarboxylate (0.12 mL, 0.77 mmol) and stirring continued for 18 h. The spent polymer support was filtered off and the solvent removed under vacuum. The residue was then purified by flash chromatography using 10 to 50% gradient of ethyl acetate in hexanes. Removal of the solvent afforded 85 mg (26%) of the desired product **6** as a clear oil: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.07 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.96 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.14 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.80 (br s, 2H),

4.46 (m, 4H), 4.37 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.29 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 494.1 *m/z*.

Step 2: Preparation of 7-Allyl-2-amino-6-ethoxy-9-β-D-ribofuranosyl-7,9-dihydro-purin-8-one (45)

[00230] To a solution of 44 (0.084 g, 0.17 mmol) in methanol (4 mL) was added solid K_2CO_3 (0.014g, 0.17 mmol) and the reaction stirred at ambient temperature for 1 h. To the cloudy mixture was added Amberlite CG-50 (0.5 g) and stirred till neutral and filtered. The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography using 100% DCM to 10 % of methanol in DCM. Removal of the solvent afforded 62 mg of 7 (99%) as a clear oil: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.93 (m, 1H), 5.25 (d, J = 32.4, Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.02 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.62 (br s, 2H), 4.47 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.25-4.45 (m, 3H), 4.21 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 3.77 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.14, J_{AB} = 12.4 Hz, 2H), 1.37 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.27 (t, 7.6, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 368.0 *m/z*.

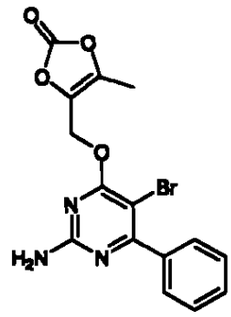
Example 3: **5-Bromo-4-ethoxy-6-phenyl-pyrimidin-2-ylamine (37)**



Step 1: Preparation of 5-Bromo-4-ethoxy-6-phenyl-pyrimidin-2-ylamine (37)

[00231] In a manner similar to step 2 of Example 2 was prepared the title compound as a white solid from 2-amino-5-bromo-6-phenyl-3H-pyrimidin-4-one 35 (Wierenga, *et al.*, *JMC*, 23, 239-240 (1980)) in 13% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (m, 2H0, 7.42 (m, 3H), 5.15 (br s, 2H), 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.44 (t, 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 294.1 $[M+2]^+$ 296.0 *m/z*. Elemental analysis for $C_{12}H_{12}BrN_3O$: calc'd: C, 49.00; H, 4.11; N, 14.29; found: C, 48.94; H, 4.18; N, 14.01.

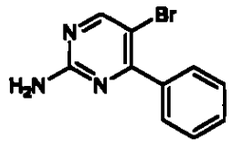
Example 4: **4-(2-Amino-5-bromo-6-phenyl-pyrimidin-4-yloxymethyl)-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one (46)**



Step 1: Preparation of 4-(2-Amino-5-bromo-6-phenyl-pyrimidin-4-yloxymethyl)-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one (46)

[00232] In a manner similar to step 2 of Example 2 was prepared the title compound as a white solid from 2-Amino-5-bromo-6-phenyl-3H-pyrimidin-4-one **35** in 4% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.62 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 5.18 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 2.26 (s, H); MS (+)-ES $[M]^+$378.2 $[M+2]^+$ 380.1 *m/z*. Elemental analysis for $C_{15}H_{12}BrN_3O_4$: calc'd: C, 47.64; H, 3.20; N, 11.11; found: C, 46.98; H, 3.23; N, 10.70.

Example 5: **5-Bromo-4-phenyl-pyrimidin-2-ylamine (48)**



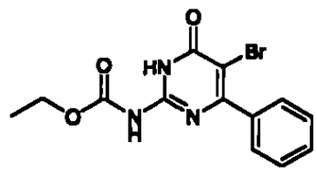
Step 1: Preparation of 4-Phenyl-pyrimidin-2-ylamine (47)

[00233] To a solution of bromobenzene (4.43 mL, 42.06 mmol) in dry THF (100 mL) at -78 °C was added BuLi (394 mL, 63.08 mmol) and the mixture left to stir at –78 °C for 2 h. To this was added 2-aminopyrimidine (2.0 g, 21.03 mmol) in hot toluene (80 mL) over a 15 minutes period. The mixture was refluxed for 16 h and allowed to cool to room temperature and carefully quenched with aqueous $NaHCO_3$. The mixture was filtered and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was then dissolved in DCM and washed with aqueous $NaHCO_3$, brine and dried (MgSO4). The solvent was removed to afford 350 mg of 47 (10%) as a pale yellow solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 7.02 (J = 4.8 Hz, 1H). 5.27 (br s, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 172.2 *m/z*.

Step 2: Preparation of 5-Bromo-4-phenyl-pyrimidin-2-ylamine (48)

[00234] Compound 47 (0.30 g, 1.75 mmol) was dissolved in glacial acetic acid (15 ml) and warmed to 45 °C. Br_2 (0.09 mL, 1.75 mmol) was added slowly. The resulting mixture was then allowed to stir at room temperature for 3 h. The solvent was removed under vacuum to a solid residue. This was then transferred onto a filter funnel and washed with DCM, followed by water. The remaining solid was then dried under high vacuum for 16 h to give 197 mg of 13 (45%) as a pale yellow solid: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.40 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 6.96 (s, 2H); MS (+)-ES $[M]^+$ 250.0 $[M+2]^+$ 252.0 *m/z*. Elemental analysis for $C_{10}H_8BrN_3$: calc'd: C, 48.02; H, 3.22; Br, 31.95; N, 16.80; found: C, 47.91; H, 3.28; Br, 32.15; N, 16.80.

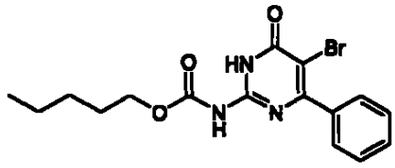
Example 6: **(5-Bromo-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl)-carbamic acid ethyl ester (36)**



Step 1: Preparation of (5-Bromo-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl)-carbamic acid ethyl ester (36)

To a solution of 35 (0.25g, 0.94 mmol) in DMF (8 mL) was added NEt_3 (0.14 mL, 0.99 mmol) and diethyl pyrocarbonate (0.27 mL, 1.89 mmol). The reaction mixture was maintained at 65 °C for 20 h. The solvent was removed and the residue treated with DCM. The resulting mixture was filtered to remove the remaining starting material 35 and the filtrate washed with aqueous $NaHCO_3$, brine and dried ($MgSO_4$). The filtrate was concentrated and purified by HPLC (Thomson ODS-A 100A 5μ 150 x 21.2 mm column; flow rate = 30 mL/min; CH_3CN with 0.05 % TFA (A), Water with 0.05 % TFA (B); Make up pump flow = 0.9 mL/min; Make up pump mobile phase; MeOH with 0.05% TFA using a gradient system as follows: t = 0; 15 % A, 85 % B; t = 3.0 min; 15 % A, 85 % B; t = 9.5 min; 70 % A, 30 % B; t = 10.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.5 min; 15 % A, 85 % B; t = 15.0 min; 15 % A, 85 % B.) to afford 54 mgs of 36 (17%) as a clear oil: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66 (m, 1H), 7.44 (m, 3H), 4.26 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.32 t, J = 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 338.1 $[M+2]^+$ 340.0 *m/z*. Elemental analysis for $C_{13}H_{12}BrN_3O_3$: calc'd: C, 46.17; H, 3.58; N, 12.43; found: C, 46.43; H, 3.74; N, 11.95.

Example 7: **(5-Bromo-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl)-carbamic acid pentyl ester (49)**

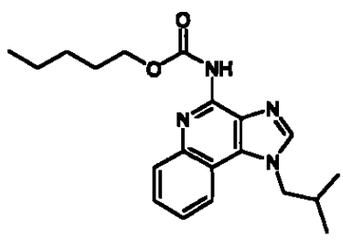


Step 1: Preparation of (5-Bromo-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl)-carbamic acid pentyl ester (49)

[00235] In a manner similar to step 1 of Example 6 the title compound was prepared from 35 and dipentyl pyrocarbonate as a clear oil in 9% yield after HPLC purification (Thomson ODS-A 100A 5μ 150 x 21.2 mm column; flow rate = 30 mL/min; CH_3CN with 0.05 % TFA (A), Water with 0.05 % TFA (B); Make up pump flow = 0.9 mL/min; Make up pump mobile phase; MeOH with 0.05% TFA using a gradient system as follows: t = 0; 35 % A, 65 % B; t = 3.0 min; 35 % A, 65 % B; t = 10 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.5 min; 35 % A, 65 % B; t = 15.0 min; 35 % A, 65 % B.). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69 (br s, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.43 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 4.17 (t, J = 7.2

Hz, 2H), 1.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.34 (m, 4H), 0.92 (t, J = 6.4 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 380.1 $[M+2]^+$ 382.1 *m/z*.

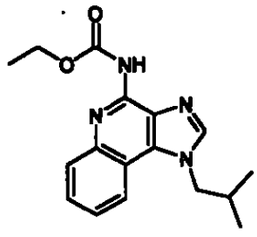
Example 8: **(1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-yl)-carbamic acid pentyl ester (34)**



Step 1: Preparation of (1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-yl)-carbamic acid pentyl ester (34)

[00236] To a suspension of 1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-ylamine 31 (0.15 g, 0.62 mmol, prepared according to the procedure given in WO94/17043) in $CHCl_3$ (5 mL) was added NEt_3 (0.09 mL, 0.65 mmol) and dipentyl pyrocarbonate (0.231 g, 0.94 mmol). The mixture was stirred at 40 °C for 60 h. The reaction mixture was washed with aqueous $NaHCO_3$, brine and dried over $MgSO_4$. The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography using a 10% to 70% gradient of ethyl acetate in hexanes to give 50.5 mg of 34 (23%) as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (br s, 1H), 8.15 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.43 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (m, 1H), 1.75 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.36 (m, 4H), 1.06 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 355.3 *m/z*.

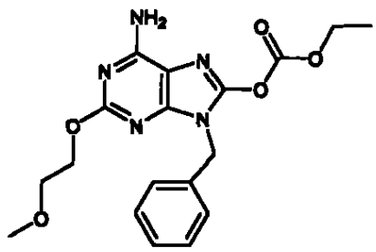
Example 9: **(1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-yl)-carbamic acid ethyl ester (50)**



Step 1: Preparation of (1-Isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-yl)-carbamic acid ethyl ester (50)

[00237] In a manner similar to step 1 of Example 8 was prepared the title compound as a white solid from 31 and diethyl pyrocarbonate in 67% yield as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.32 (br s, 2H), 8.2 (d, J = 8.0 Hz, 2H) 8.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.74 (t, J = 8.0 Hz,1H) 4.43 (m, 4H), 2.35 (m, 1H), 1.39 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.08 (d, J = 6.4 Hz, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 313.2 *m/z*.

Example 10: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester ethyl ester (51)**

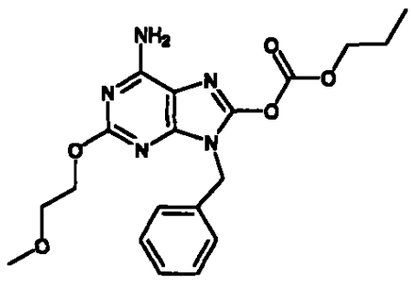


Step 1: Preparation of Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-8-yl ester ethyl ester (51)

[00238] 6-Amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-ol, 29 (11.75 mg, 0.027 mmol, prepared according to the procedure described by Kurimota, *et al., Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1091-109 (2004) was suspended in CH_2Cl_2 (0.6 mL) and cooled to 0 °C. DIEA (11.96 µL, 0.068mmol) and ethyl chloroformate (3.86 mg, 0.036 mmol, added as a 10% by volume solution in dichloromethane) were then added to the suspension. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 10 minutes then allowed to warm to room temperature for 15 minutes. TLC of the reaction mixture shows that starting material remained. The reaction mixture was heated to 35 °C, DMAP (cat.), methanol (60 µL portions) was added to dissolve 29, and additional aliquots of ethyl chloroformate (3.86 mg, 0.036 mmol, added as a 10% by volume solution in dichloromethane) were added until the reactions was complete. The crude mixture was purified by flash chromatography using a 0 to 100% gradient of ethyl acetate in hexane. The desired peaks were collected and concentrated in-vacuo to yield 8.5 mg (80%) of compound 51 as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.46 (m, 4H), 3.74 (m, 2H), 3.42 (s, 2H), 1.46 (t, 3H); MS [M+H]+ m/z 388.3.

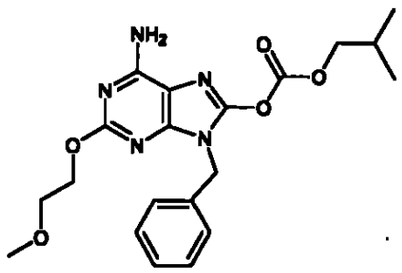
[00239] Examples 11-20 were prepared from 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-8-ol, 29 and the appropriate chloroformate according to the procedure described in Example 10.

Example 11: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester propyl ester (52)**



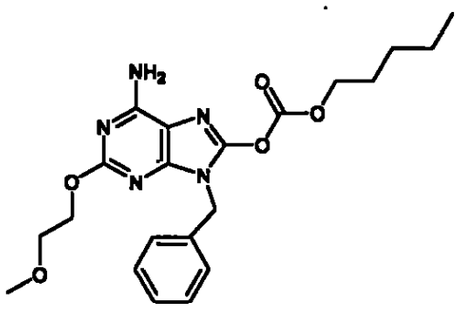
86% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.46 (m, 4H), 3.74 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.46 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 402.2.

Example 12: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester isobutyl ester (53)**



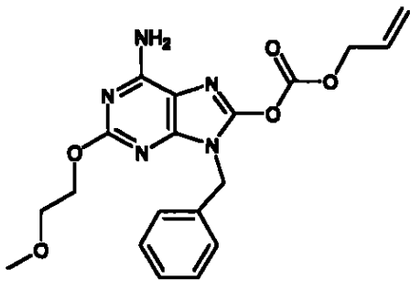
[00240] 92% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.4 Hz 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.45 (m, 2H), 4.17 (d, J =7.4 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.4 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 6H); MS [M+H]+ m/z 416.3.

Example 13: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester pentyl ester (54)**



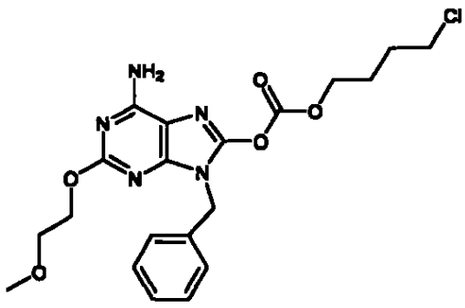
[00241] 92% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.45 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.4 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.82 (m, 2H), 1.40 (m, 4H), 0.93 (t, J = 6.8 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 430.2.

Example 14: **Carbonic acid allyl ester 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester (55)**



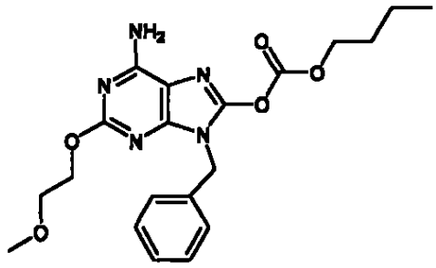
[00242] 93% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (m, 3H), 6.0 (m, 1H), 5.5 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.89 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.46 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.74 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H); MS [M+H]+ m/z 400.2.

Example 15: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester 4-chloro-butyl ester (56)**



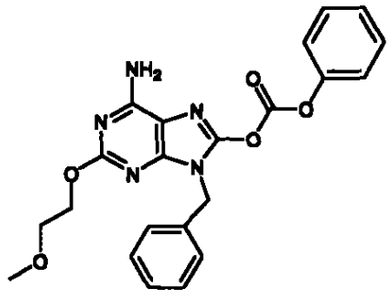
[00243] 98% yield as a white solid: 1H ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.45 (m, 4H), 3.63 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H),. 1.99 (m, 4H); MS [M+H]+ m/z 450.2.

Example 16: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-8-yl ester butyl ester (57)**



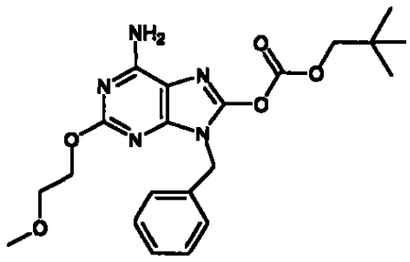
[00244] 100% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.41 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.48 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 416.2.

Example 17: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester phenyl ester (58)**



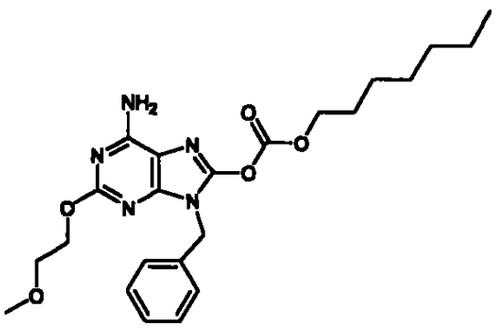
[00245] 100% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.30 (m, 3H), 7.25 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.47 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H); MS [M+H]+ m/z 436.2.

Example 18: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-8-yl ester 2,2-dimethyl-propyl ester (59)**



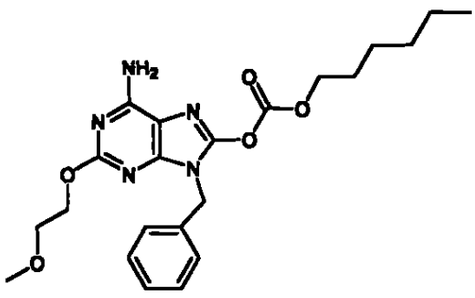
[00246] 100% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.43 (d, 2H), 7.25 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.47 (t, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.75 (t, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.07 (s, 9H); MS [M+H]+ m/z 430.2.

Example 19: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-8-yl ester heptyl ester (60)**



[00247] 100% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.46 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.74 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.8 (m, 2H), 1.4 (m, 2H), 1.3 (m, 6H) 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 458.3.

Example 20: **Carbonic acid 6-amino-9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-8-yl ester hexyl ester (30)**

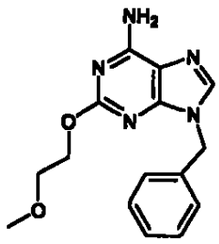


[00248] 74% yield as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.45 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.41 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.81 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.26 (m, 2H), 0.89 (t, J = 2 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 444.4.

[00249] Examples 22 and 23 were prepared from 9-benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-6-ylamine, 62, via 9-benzyl-8-bromo-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-6-ylamine,

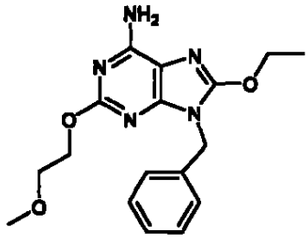
63 and sodium ethoxide or methoxide respectively according to the procedures of Kurimota *et al., Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1091-1099 (2004).

Example 21: **9-Benzyl-2-(2-methoxy-ethoxy)-9H-purin-6-ylamine (62)**



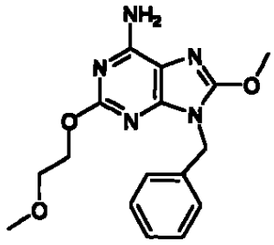
[00250] 100% yield as a brown solid: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.59 (s, 1H), 7.27 (m, 5H), 5.83 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.49 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 300.2.

Example 22: **9-Benzyl-8-ethoxy-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-6-ylamine (64)**



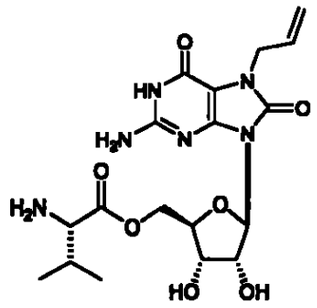
[00251] 91% yield as a brown solid: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.24 (m, 2H), 7.24 (m, 3H), 5.00 (s, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.27 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.26 (s, 3H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 344.1.

Example 23: **9-Benzyl-8-methoxy-2-(2-methoxy-ethoxy)-9*H*-purin-6-ylamine (65)**



[00252] 91% yield as a brown solid: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.28 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 6.86 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.26 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.58 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 330.2.

Example 24: **7-Allyl-2-Amino-9-(5'-*O*-L-valinyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1*H*-purine-6,8-dione (68)**



Step 1: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3'-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1H-purine-6,8-dione (66)

[00253] Compound 17 (0.17g, 0.49 mmol) was dissolved in DMF (4.0 mL) and acetone (3.0 mL) was added to the solution. To the mixture was added 2,2-dimethoxypropane (0.18 mL, 1.47 mmol) and $MeSO_3H$ (0.02 mL, 0.05mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 20 h and quenched with saturated aqueous $NaHCO_3$. The aqueous phase was then extracted (4x) with CH_2Cl_2. The combined organic phase was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated under vacuum to afford 130 mg of 66 in 70% yield as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.97 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.93 (m, 1H), 5.34 (dd, J = 4.4, 2.0 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 5.12 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.52 (d, J = 5.6, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.71 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.36 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 380.0 *m/z*.

Step 2: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3'-O-isopropylidene-5'-N-tert-butoxycarbonyl-L-valinyl)-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1H-purine-6,8-dione (67)

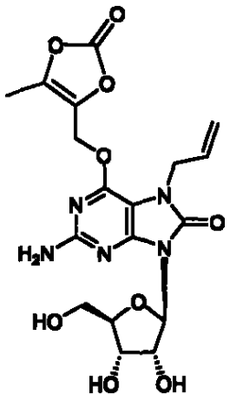
[00254] A mixture of 66 (0.13 g, 0.34 mmol), BOC-Valine (0.08 g, 0.36 mmol), EDC (0.07g, 0.38 mmol), DMAP (0.05g, 0.38 mmol) in THF (8.0 mL) and pyridine (0.8 mL) under N_2 atmosphere was stirred at ambient temperature for 16 h. The solvents were removed under vacuum and the residue dissolved in EtOAc. The organic phase was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$, brine, dried ($MgSO_4$) and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and the purified by flash chromatography using a 2% to 5% gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to give 180 mg of 67 (91%) as pale yellow solid: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.07 (s, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.56 (br s, 2H), 5.41 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.15 (m, 3H), 4.97 (br s, 1H), 4.53 (br s, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 578.9 *m/z*.

Step 3: 7-Allyl-2-Amino-9-(5'-O-L-valinyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1H-purine-6,8-dione (68)

[00255] To a solution of 67 (0.18 g, 0.311 mmols) in MeOH (10 mL) was added AcCl (0.86 mL, 12.07 mmol) under N_2 atmosphere. The reaction mixture was left to stir at ambient temperature for 18 h and thereafter carefully neutralized with saturated aqueous

$NaHCO_3$. To the mixture was added silica gel and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography using a 10% to 20% gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to give 80 mg of **68** (59%) as a white solid: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.72 (br s, 2H), 5.84 (m, 1H), 5.59 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.15 (br s, 1H), 5.07 (d, J = 12 Hz, 1H), 5.0 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 4.77 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (m, 3H), 4.26 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.57 (br s, 1H), 2.01 (m, 1H), 0.86 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 5.2 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 439.1 *m/z*.

Example 25: **7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-6-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-7,9-dihydro-purin-8-one (71)**



Step 1: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-7,9-dihydro-1H-purine-6,8-dione (**69**)

[00256] To a solution of **17** (0.46 g, 1.36 mmol) and imidazole (0.93 g, 13.64 mol) in DMF (13 mL) was added chlorotriethylsilane (0.92 mL, 5.46 mmol) dropwise and stirred at ambient temperature for 2.5 h. The reaction mixture was treated with saturated aqueous $NaHCO_3$ and the resulting two phases separated. The aqueous phase was washed with diethyl ether (2x). The organic layers were combined and washed with water, dried ($MgSO_4$) and concentrated after filtration. The residue was purified by flash chromatography using a 2% to 10% gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to give 830 mg of **69** (89%) as pale yellow oil: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.92 (m, 1H), 5.85 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.3 (m, 1H), 5.15 - 5.23 (m, 2H), 5.09 (br s, 2H), 4.54 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.33 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.67 – 3.80 (m, 2H), 0.85 – 1.02 (m, 26H), 0.48 – 0.71 (m, 19H): MS (+)-ES $[M]^+$ 682.6 *m/z*.

Step 2: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-(2',3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-6-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-7,9-dihydro-purin-8-one (**70**)

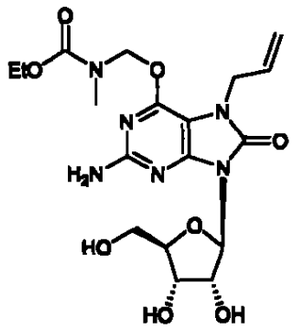
[00257] In a manner similar to Step 1 of Example 2, compound **70** was prepared from compound **69** and 4-hydroxymethyl-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one (prepared according to the procedure of Alepegiani, *Syn. Comm.*, 22(9), 1277-82 (1992)) in 5% yield as a white solid after HPLC purification (Thomson ODS-A 100A 5u 50 x 21.2 mm column; flow rate

= 30 mL/min; CH_3CN with 0.05 % TFA (A), Water with 0.05 % TFA (B); Make up pump flow = 1.0 mL/min; Make up pump mobile phase; MeOH with 0.05% TFA using a gradient system as follows: t = 0; 50 % A, 50 % B; t = 2.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 5.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 9.5 min; 100 % A, 0 % B; t = 10.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 13.0 min; 50 % A, 50 % B.); MS (+)-ES $[M]^+$ 794.1 *m/z*.

Step 3: Preparation of 7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-6-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-7,9-dihydro-purin-8-one (71)

[00258] To a solution of 70 (9.0 mg, 0.012 mmol) in MeOH (1.5 mL) was added $3HF{\cdot}NEt_3$ (0.01 mL, 0.07 mmol) and stirred at ambient temperature for 16 h. The solvent was removed under vacuum and the residue purified by flash chromatography. The desired product was eluted with 2% to 5% gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to afford 3.26 mg of 71 (64%) as white solid: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 5.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.17 (m, 4H), 4.96 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.25 (J = 5.2 Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 3.81 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.17, J_{AB} = 11.6 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H): MS (+)-ES $[M+H]^+$ 452.4 *m/z*.

Example 26: **(7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-8-oxo-8,9-dihydro-7*H*-purin-6-yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (73)**



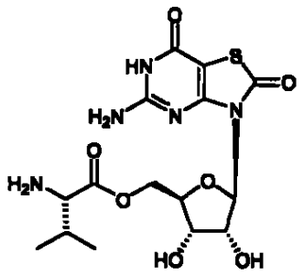
Step 1: Preparation of (7-Allyl-2-amino-9-*(2'3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)*-8-oxo-8,9-dihydro-7*H*-purin-6-yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (72)

[00259] In a manner similar to Step 1 of Example 2 compound 72 was prepared in 4% yield from compound 69 and *N-methyl-N-(hydroxymethyl)urethane* (Kelper, *JOC*, 52, 1987, p.453-455) as a white solid after HPLC purification: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.94 (m, 1H), 5.82 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.53 (br s, 1H), 5.23 – 5.29 (m, 2H), 5.15 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.35 (br s, 1H), 4.21 (m, 2H), 3.96 (br s, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 1.30 (m, 4H), 0.87 – 1.01 (m, 24H), 0.57 – 0.68 (m, 19H): MS (+)-ES $[M+H]^+$ 797.7 *m/z*.

Step 2: Preparation of (7-Allyl-2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-8-oxo-8,9-dihydro-7H-purin-6- yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (73)

[00260] In a manner similar to Step 3 of Example 25 was prepared the title compound 73 in 64% as a white solid after HPLC purification (Thomson ODS-A 100A 5μ 50 x 21.2 mm column; flow rate = 30 mL/min; CH_3CN with 0.05 % TFA (A), Water with 0.05 % TFA (B); Make up pump flow = 1.0 mL/min; Make up pump mobile phase; MeOH with 0.05% TFA using a gradient system as follows: t = 0; 50 % A, 50 % B; t = 2.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 5.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 9.5 min; 100 % A, 0 % B; t = 10.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 13.0 min; 50 % A, 50 % B.). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.92 (m, 1H), 5.92 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.51 (m, 2H), 5.22 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 6.0, 2H), 4.40 (d, J = 6.0, 1H), 4.21 (m, 3H), 3.79 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.178, J_{AB} = 14.0 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H): MS (+)-ES $[M]^+$ 455.4 *m/z*.

Example 27: **5-Amino-3-(5'-O-L-valinyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione Dihydrochloride (24)**



Step 1: *Preparation of 5-Amino-3-(2',3'-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl) thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione* (22)

[00261] To a heterogeneous mixture of 21 (5.37 g, 17.0 mmol, prepared according to the procedure given in U.S. Patent No. 5,041,426 (Example 2), which is incorporated by reference in its entirety) in acetone (40 mL) contained in a 250 mL Morton flask was added successively 2,2-DMP (6.26 mL, 50.9 mmol), DMSO (6.6 mL), and $MeSO_3H$ (220 µL, 3.39 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred vigorously, becoming homogeneous and golden yellow as the diol was consumed. TLC analysis (SiO_2, 10% MeOH-$CHCl_3$) indicated reaction completion after 6 h. Undissolved solids were removed via gravity filtration using fluted Whatman type 1 filter paper. This was followed by pouring of the filtrate into 10 volumes of ice water (~400 mL), resulting in immediate precipitation of a white solid. After a brief period of stirring, $NaHCO_3$ (285 mg, 3.39 mmol) dissolved in water (10 mL) was added to neutralize the $MeSO_3H$. Vigorous stirring in the Morton reactor was continued for 15 min, whereupon the mixture was filtered through a coarse scintered glass funnel. The solid material was washed with ice water (100 mL), air dried, then dried further under high vacuum at 65 °C, affording 5.36 g (88%) of the acetonide 22 as a white solid: mp 280-81 °C; ^{1}H (DMSO-d_6) δ 1.28 (s, 3H), 1.47 (s,

3H), 3.43-3.55 (m, 2H), 3.95-3.99 (m, 1H), 4.77-4.80 (m, 1H), 4.88-4.91 (m, 1H), 5.24-5.26 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.97 (br s, 2H), 11.25 (s, 1H).

Step 2: Preparation of 5-Amino-3-(2',3'-O-isopropylidene –5'-N-tert-butoxycarbonyl-L-valinyl)-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione **(23)**

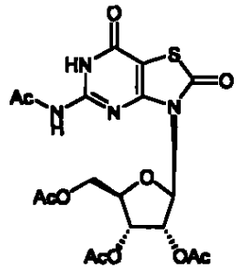
[00262] To a solution of *N*-butoxycarbonyl-(L)-valine (671 mg, 2.81 mmol) in THF (9 mL) at 0 °C was added EDC (588 mg, 3.07 mmol). The resultant homogeneous mixture was stirred 45 min at 0 °C, at which point it had become heterogeneous, and solid acetonide **2** from Step 1 above (1.00 g, 2.81 mmol) was added as one portion. Subsequently added was solid DMAP (522 mg, 4.27 mmol). The reaction mixture was permitted to reach room temperature, and stirred an additional 5 h, whereupon it was concentrated at 25 °C via rotary evaporation to a yellow syrup. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL), partitioned with 1 N HCl (10 mL) followed by neutralization of acid with saturated aqueous $NaHCO_3$ (10 mL). The acidic aqueous phase was further extracted with EtOAc (2 x 50 mL), and then partitioned with the basic aqueous phase. The combined organic phases were dried over Na_2SO_4, filtered through a short pad of SiO_2, and concentrated, affording 1.480 g (96%) of Boc-protected amino acid ester **23** as a foam: mp 158 °C (dec); ^1H ($CDCl_3$) δ 0.86 (d, J = 7.0, 3H), 0.95 (d, J = 7.0, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.56 (s, 3H), 1.75 (br s, 1H), 2.08-2.19 (m, 1H), 4.20-4.24 (m, 2H), 4.30-4.37 (m, 1H), 4.56 (dd, J = 11.0, 5.9, 1H), 4.96 (dd, J = 6.2, 3.7, 1H), 5.11 (br d, J = 8.8, 1H), 5.29 (br d, J = 6.6, 1H), 5.88 (br s, 2H), 6.23 (s, 1H).

Step 3: Preparation of 5-Amino-3-(5'-O-L-valinyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione Dihydrochloride **(24)**

[00263] A stream of HCl gas was passed through a bubbler of concentrated H_2SO_4, and subsequently directed (via fritted dispersion tube) into a 250 mL 3-neck Morton flask containing dry isopropyl acetate (80 mL) at 0 °C until a saturated solution was obtained. To this was added a solution of the Boc-amino acid ester from Step 2 above (5.53 g, 9.95 mmol) in isopropyl acetate (30 mL), resulting in the formation of a white solid precipitate within 5 min. To this was added 10% (v/v) IPA (11 mL). The reaction mixture was warmed to room temperature, then stirred 12 h. The heterogeneous reaction mixture was diluted with dry toluene (100 mL). Filtration using a medium pore scintered glass funnel under N_2 provided an off-white, amorphous solid. Trituration of the solid in dry THF was followed by filtration and vacuum drying at 65 °C, affording 3.677 g (81%) of the title compound **24** as a white solid: mp 166-68 °C (dec); ^1H (DMSO-d_6) δ 0.90 (d, J = 7.0, 3H), 0.94 (d, J = 7.0, 3H), 2.14-2.18 (m, 1H), 3.83-3.85 (m, 1H), 3.96-4.00 (m, 1H), 4.23-4.28 (m, 2H), 4.42 (dd, J = 11.7, 3.4, 1H), 4.75 (dd, J = 10.3, 5.5, 1H), 5.81 (d, J = 4.4, 1H),

6.46 (br s, 3H), 7.23 (br s, 2H), 8.47 (s, 3H), 11.5 (br s, 1H). Elemental analysis for $C_{15}H_{21}N_5O_7S \cdot 2HCl$: calc'd: C, 36.89; H, 4.75; Cl, 14.52; N, 14.34; S, 6.57; found: C, 37.03: H, 4.74; Cl, 14.26; N, 14.24; S, 6.42.

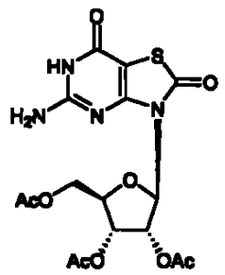
Example 28: **5-Acetylamino-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine-2,7(6*H*)-dione (74)**



Step 1: Preparation of 5-Acetylamino-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7(6H)-dione (74)

[00264] Anhydrous 21 (8.0 g, 39.5 mmol) was dissolved in dry pyridine (65 mL). DMAP (3.1g, 25.3 mmol) and acetic anhydride (19.1 mL 202.4 mmol) were added sequentially. The reaction was allowed to progress for 2 h at room temperature, whereupon it was quenched with saturated $NaHCO_3$ (100 mL) and extracted with DCM (3 x 200 mL). The organic phase was concentrated, and then triturated with ether. This provided 12.5 g (103%) of slightly impure 5-acetylamino-3-(2,3,5-tri-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo-[4,5-*d*]pyrimidin-2,7(6H)-dione as a white solid 74: mp 246.7-248.1 °C; R_f= 0.20 (SiO_2, 50% EtOAc-$CHCl_3$); ^{1}H NMR (400MHz, d_6-DMSO) δ 12.23 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 5.97 (m, 2H), 5.48 (t, J = 6, 1H), 4.35-4.40 (m, 1H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.08-4.18 (m, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

Example 29: **5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine-2,7(6*H*)-dione (75)**

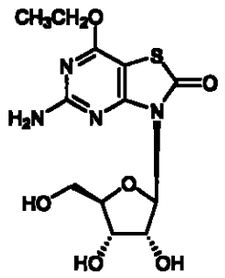


Step 1: Preparation of 5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7(6H)-dione (75)

[00265] To a suspension of 21 (5.00 g, 15.8 mmol) in acetonitrile (160 mL) at 0 °C was added successively Et_3N (11.0 mL, 79.0 mmol), DMAP (195 mg, 1.59 mmol), and Ac_2O (4.47 mL, 47.4 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h,

whereupon it was concentrated to a brown syrup. The residue was purified by flash column chromatography (silica, MeOH/$CHCl_3$ = 1-10%) to afford 6.22 g (89%) of triacetate **75** as a white solid: mp 198-199 °C; ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 11.34 (s, 1H), 7.02 (br s, 2H), 5.90 (m, 2H), 5.51 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.08 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 443.3.

Example 30: **5-Amino-7-ethoxy-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (77)**



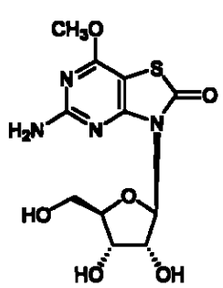
Step 1: Preparation of 5-Acetylamino-7-ethoxy-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**76**)

[00266] In a manner similar to Example 2, step 1, **76** was prepared from **74** and ethanol in 72% yield as a white foam: MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 513. R_f = 0.45 (75% Ethyl acetate-$CHCl_3$).

Step 2: Preparation of 5-Amino-7-ethoxy-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2-one (**77**)

[00267] In a manner similar to Example 2, step 2, the title compound was prepared from **76** in 65% yield as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.87 (s, 2H), 5.85 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.09 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.58 (m,1H), 3.40 (m, 1H), 1.29 (m, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 445, $[2M+H]^+$ *m/z* 689. R_f = 0.2 (50% THF-$CHCl_3$). Elemental Analysis for $C_{12}H_{16}N_4O_6S \cdot 0.25\ H_2O$: calc'd: C, 41.31; H, 4.77; N, 16.06; S, 9.19. Found: C, 41.24; H, 4.71; N, 15.89; S, 9.06.

Example 31: **5-Amino-7-methoxy-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (79)**



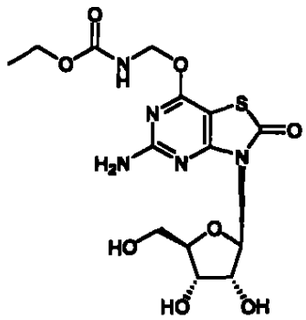
Step 1: Preparation of 5-Acetylamino-7-methoxy-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**78**)

[00268] In a manner similar to Example 2, step 1, **77** was prepared from **74** and methanol in 65% yield as a white foam: MS (+)-ES $[M+H]^+$ 499. R_f = 0.5 (75% Ethyl acetate-$CHCl_3$).

Step 2: Preparation of 5-Amino-7-methoxy-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**79**)

[00269] In a manner similar to Example 2, step 2, the title compound was prepared from **78** in 78% yield as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.91 (s, 2H), 5.86 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.75 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.43 (m, 1H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 331. R_f = 0.2 (50% THF-$CHCl_3$). Elemental Analysis for $C_{11}H_{14}N_4O_6S \cdot 0.25\ H_2O$: calc'd: C, 39.46; H, 4.37; N, 16.73; S, 9.58. Found: C, 39.59; H, 4.17; N, 16.55; S, 9.52.

Example 32: **(5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosyl-2,3-dihydro-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7-yloxymethyl)-carbamic acid ethyl ester (82)**



Step 1: Preparation of 5-Amino-3-(2',3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2,7-dione (**80**)

[00270] To a suspension of **21** (1.00 g, 3.16 mmol) in DMF (20 mL) at room temperature was added successively imidazole (753 mg, 11.06 mmol), DMAP (39 mg, 0.32 mmol), and chlorotriethylsilane (1.64 mL, 9.80 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, whereupon it was quenched by saturated $NaHCO_3$ solution (20 mL). The mixture was extracted with $CHCl_3$ (3 x 20 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography (silica, MeOH/$CHCl_3$ = 1-5%) to afford 1.91 g (92%) of compound **80** as a white solid: ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 5.99 (s, 1H), 5.62 (br s, 2H), 5.19 (dd, J = 4.4, 6.0 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 2.8, 4.4 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.77 (dd, J = 7.6, 10.8 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 4.8, 10.4 Hz, 1H), 1.10 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.68 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 0.61 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 0.54 (m, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 660.0.

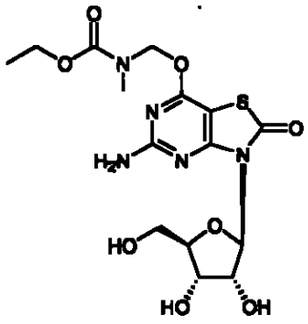
Step 2: Preparation of 5-Amino-3-(2',3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)- 2,3-dihydro-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yloxymethyl)-carbamic acid ethyl ester (**81**)

[00271] In a manner similar to Step 1 of Example 2, compound **81** was prepared from **80** and *N*-ethylurethane as a white solid in 31% yield: $[M+H]^+$ 760.5; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.43 (br s, 2H), 6.09 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 5.19 (dd, J = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 4.19 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.76 (dd, J = 10.8, 7.6 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 10.4, 4.8 Hz, 1H), 1.29 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 0.90 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.69 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 0.61 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 0.55 (m, 2H); $[M+H]^+$ 760.5.

Step 3: Preparation of (5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosyl-2,3-dihydro-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yloxymethyl)-carbamic acid ethyl ester (**82**)

[00272] A solution of **81** (244 mg, 321 μmol), 5M HF in pyridine (321 μL, 1.60 mmol) and THF (3.20 mL) were stirred at room temperature for 5 h. Removal of the solvents under vacuum left a residue that was purified by flash chromatography (SiO_2, 10% MeOH-$CHCl_3$) to afford **82** (119 mg, 90%) as a white solid: ^1H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.43 (br s, 1H), 7.76 (br s, 2H), 5.82 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.78 (s, 2H), 5.32 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.24 (dd, J = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.82 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.68 (t, J = 6.0, 1H), 4.11 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.78 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 418.2.

Example 33: **(5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosyl-2,3-dihydro-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7-yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (84)**



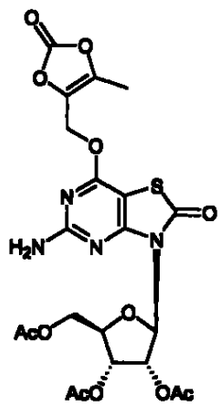
Step 1: Preparation of (5-Amino-2-oxo-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydro-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (**83**)

[00273] In a manner similar to Example 2, step 1, compound **83** was prepared from **75** and *N*-methyl-*N*-(hydroxymethyl)urethane as a white solid in 24% yield: R_f = 0.4 (33% EtOAc-$CHCl_3$); ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.49 (br s, 1H), 6.08 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.75 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.49 (dd, J = 13.5, 8.4 Hz, 1H), 4.30 (m, 5H), 3.62 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.36 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.20 (t, J = 6.8 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 614.2.

Step 2: Preparation of (5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosyl-2,3-dihydro-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yloxymethyl)-methyl-carbamic acid ethyl ester (**84**)

[00274] In a manner similar to Example 1, step 4, the title compound was prepared from **83** as a white solid in 20% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.86 (br s, 2H), 5.82 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.31 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.82 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.67 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.78 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 1.27 (t, J = 6.8 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 432.3.

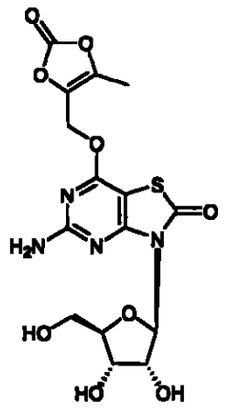
Example 34: **5-Amino-7-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (85)**



Step 1: Preparation of 5-Amino-7-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**85**)

[00275] To a solution of triacetate **75** (1.55 g, 3.50 mmol) in THF (50 mL) at 0 °C was added polymer supported-triphenylphosphine (4.95 g, 10.50 mmol, Argonaut). To this mixture was added 4-hydroxymethyl-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one (0.91 g, 7.00 mmol), prepared according to the procedure of Alepegiani, *Syn. Comm.*, 22(9), 1277-82 (1992) Diethyl azodicarboxylate (0.73 ml, 4.60 mmol) was then added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 48 h, filtered and washed with MeOH and $CHCl_3$. The filtrate was concentrated and purified by flash column chromatography (silica, acetone/$CHCl_3$ = 10-20%) to afford dioxolone derivative **85** (1.38 g, 71%) as white solid: ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO); δ 7.06 (s, 2H), 6.00 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.92 (dd, J = 6.6, 4.4 Hz, 1H), 5.56 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.38 (dd, J = 11.6, 3.6 Hz, 1H), 4.25 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 4.10 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 555.3. Elemental Analysis calc'd for $C_{21}H_{22}N_4O_{12}S \cdot Me_2CO$: C, 47.06; H, 4.61; N, 9.15; S, 5.23. Found: C, 47.25; H, 4.37; N, 9.53; S, 5.52.

Example 35: **5-Amino-7-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (87)**



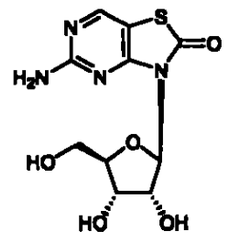
Step 1: Preparation of 5-Amino-7-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-3-(2',3',5'-tris-O-triethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**86**)

[00276] In a manner similar to Example 34, compound **86** was prepared from **80** and 4-hydroxymethyl-5-methyl-[1,3]dioxol-2-one as a white solid in 45% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.06 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.21 (dd, J = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 4.94 (br s, 2H), 4.38 (dd, J = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.79 (dd, J = 11.2, 8.0 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 10.8, 5.2 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.02 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 8.4 Hz, 3H), 0.70 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 0.61 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 0.53 (m, 2H); $[M+H]^+$ 771.5.

Step 2: Preparation of 5-Amino-7-(5-methyl-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-3-β-D-ribofuranosyl-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**87**)

[00277] In a manner similar to Steps 3 of Example 32, the title compound was prepared from **86** as a white solid in 89% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.03 (br s, 2H), 5.90 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 5.02 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.83 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.71 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.14 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.80 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 2.27 (s, 3H); $[M+H]^+$ 429.2.

Example 36: **5-Amino-3-β-D-ribofuranosyl-3*H*-thiazolo-[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (90)**



Step 1: Preparation of 5-Amino-7-thiaxo-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**88**)

[00278] To a solution of **75** (1 g, 2.26 mmol) in pyridine (50 mL) was added at room temperature P_2S_5 (2.13 g, 4.79 mmol). The solution was refluxed gently (bath temperature 130 – 140 °C) for 29 h. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuo. The excess P_2S_5 was decomposed by the addition of H_2O (40 mL) at 60 °C. The mixture was

stirred for 1 h at 60 °C and then cooled to room temperature. The mixture was extracted with $CHCl_3$ (3 x 40 mL). The dried ($MgSO_4$) organic layer was evaporated to yield a syrup, which was purified by flash column chromatography (silica, acetone/$CHCl_3$ = 15%) to afford 0.93 g (90%) of **88** as a yellow solid: ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 12.50 (s, 1H), 7.35 (br s, 2H), 5.89 (m, 2H), 5.51 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.10 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 459.3.

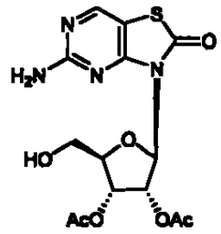
Step 2: Preparation of 5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**89**)

[00279] A suspension of Raney® 2800 nickel (3 big spatula, pre-washed with H_2O, MeOH and acetone) in acetone (50 mL) was stirred at refluxing for 1 h. Triacetate **88** (0.93 g, 2.03 mmol) was subsequently added into the above suspension at reflux. The mixture was stirred for 5 min, cooled to room temperature over 30 min. The reaction was quenched by bubbling H_2S (g) into the mixture for 2 h. The resulting mixture was filtered through a short pad of Celite® and washed with EtOH. The filtrate was concentrated and purified by flash column chromatography (silica, MeOH/$CHCl_3$ = 1-2%) to afford 0.52 g (60%) of **89** as a white solid: mp 121-123 °C; ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.38 (s, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.03 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.93 (dd, J = 6.4, 3.6 Hz, 1H), 5.58 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 11.6, 3.6 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 427.2. Elemental Analysis calc'd for $C_{16}H_{18}N_4O_8S \cdot 0.5\ CH_3OH \cdot 0.25\ H_2O$: C, 44.34; H, 4.62; N, 12.54; S 7.17. Found: C, 44.54; H, 4.88; N, 12.16; S, 7.17.

Step 3: Preparation of 5-Amino-3-β-D-ribofuranosyl-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (**90**)

[00280] To a solution of **89** (0.52 g, 1.22 mmol) in MeOH (20 mL) was added K_2CO_3 (25 mg, 0.18 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight, then neutralized with AcOH (21 μL, 0.36 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for additional 30 min, concentrated, and triturated with H_2O (2 ml) to afford 0.33 g of compound **90** (89%) as a white solid: mp 220 °C (Dec); ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.34 (s, 1H), 6.85 (s, 2H), 5.90 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.81 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.67 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (dd, J = 10.8, 4.8 Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.44 (m, 1H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 301.1. Elemental Analysis calc'd for $C_{10}H_{12}N_4O_5S \cdot 0.3\ H_2O$: C, 39.29; H, 4.15; N, 18.33; S 10.49. Found: C, 39.51; H, 4.18; N, 17.95; S, 10.27.

Example 37: **5-Amino-3-(2',3'-di-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-3*H*-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (93)**



Step 1: Preparation of 5-Amino-3-(5'-O-tert-butyl-dimethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (91)

[00281] To a solution of **90** (0.68 g, 2.28 mmol) in DMF (10 mL) was added imidazole (0.54 g, 7.93 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (0.68 g, 4.56 mmol) sequentially. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, at which point it was concentrated and purified by flash column chromatography (silica, MeOH/$CHCl_3$; gradient = 5-20%) to afford 0.49 g (52%) **91** as a white solid: ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.33 (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 5.90 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.33 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.79 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.16 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 12.0, 7.2 Hz, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.00 (s, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 415.4.

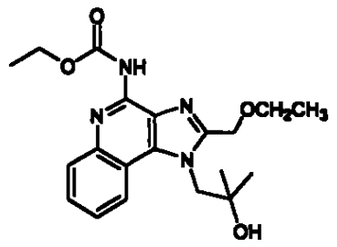
Step 2: Preparation of 5-Amino-3-(2',3'-di-O-acetyl, 5'-O-tert-butyl-dimethylsilanyl-β-D-ribofuranosyl)-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (92)

[00282] To a solution of **91** (0.20 g, 0.48 mmol) in acetonitrile (5 mL) at 0 °C was added successively Et_3N (0.26 mL, 1.86 mmol) and Ac_2O (91 μL, 0.96 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, whereupon it was concentrated and purified by flash column chromatography (silica, acetone/$CHCl_3$: gradient = 5-10%) to afford 0.22 g (92%) of **92** as a white solid: ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.36 (s, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.00 (m, 2H), 5.57 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.07 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (d, J = 2.4 Hz, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 499.5.

Step 3: Preparation of 5-Amino-3-(2',3'-di-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidin-2-one (93)

[00283] To a solution of **92** (0.22 g, 0.44 mmol) in THF (5 mL) in a plastic vial was added HF/pyridine (0.70 mL). The reaction was stirred for 2h, concentrated and purified by flash column chromatography (silica, MeOH/$CHCl_3$: gradient = 5-10%) to afford 0.17 g (100%) of the title compound as a white solid: mp 109-111 °C; ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.37 (s, 1H), 6.91 (s, 2H), 6.00 (m, 2H), 5.48 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.91 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 10.4, 6.0 Hz, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 385.3. Elemental Analysis calc'd for $C_{14}H_{16}N_4O_7S \cdot 0.5\ CH_3OH \cdot 0.2\ CHCl_3$: C, 41.61; H, 4.32; N, 13.21; S 7.56: Found: C, 41.73; H, 4.29; N, 12.86; S, 7.33.

Example 38: **[2-Ethoxymethyl-1-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-1*H*-imidazo[4,5-c]quinolin-4-yl]-carbamic acid ethyl ester (39)**



Step 1: Preparation of [2-Ethoxymethyl-1-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-1H-imidazo[4,5-

[00284] In a manner similar to step 1 of Example 8 except, substituting MeOH as the solvent, was prepared the title compound from 1-(4-amino-2-ethoxymethyl-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl)-2-methyl-propan-2-ol (38) (prepared according to the procedure given in International Publication No. WO 94/17043) and diethyl pyrocarbonate as an oil in 39% yield: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.96 (br s, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.39 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.62 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.40 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (br s, 6H), 1.24 (t, J = 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 387.4 *m/z*.

6.4 Masking Effect of TLR7 Ligand Prodrugs

[00285] A typical experiment would use human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from a healthy donor and placed in replicate cell culture wells; typically, $2x10^6$ to $5x10^6$ cells are placed in each well. The PBMC are incubated in the absence of test compounds at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 24 hours to allow stabilization to the culture conditions, and then 100 micromolar isatoribine, the TLR7 ligand and a corresponding TLR7 ligand prodrug are added to separate wells containing PBMC from the same donor; untreated controls are included. The concentrations of TLR7 ligand and TLR7 ligand prodrug may be varied to suit the particular experiment, and the PBMC cultures are then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for a period of time ranging from two hours to 48 hours. Samples of cell culture supernate media are taken during the incubation. These are assayed for cytokine production by ELISA. Additionally the amount of TLR7 ligand and TLR7 ligand prodrug remaining at the end of the incubation may be assayed by LC-MS. Cytokine production is calculated relative to production in the isatoribine control, following subtraction of the cytokine production in untreated controls. The cytokine results are compared to determine the extent that the TLR7 ligand is more active than the corresponding TLR7 ligand prodrug.

[00286] Thus, if the TLR7 ligand generates more interferon alpha (a conveniently measured cytokine) than does the corresponding TLR7 ligand prodrug after a similar duration of exposure and concentration, the TLR7 ligand prodrug may be deemed a

"masked" TLR7 ligand prodrug. The magnitude of reduction in cytokine production that constitutes "masking" may be as little as a 25% reduction relative to the parent TLR, since this would afford a corresponding increase in administered dose for a given level of tolerability.

[00287] Tables 9 through 14 provide data illustrating that TLR7 ligands of multiple chemical classes can be masked. The examples shown demonstrate substantial masking relative to the parent TLR7 ligand. The chemical substitutions shown are exemplary, and in no way restrictive of the invention, since additional chemical substitutions may also exhibit masking and are contemplated in the invention. Masking can be achieved by introduction of substitutions at a range of locations on any TLR7 ligand, and as shown can incorporate a variety of chemical linkages. It will be appreciated that the preferred substitution and linkage may vary for different parent TLR7 ligands.

Table 9: Masking of Isatoribine Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule: Isatoribine	21	100
Prodrug: Amino acid ester	24	1
Prodrug: Deoxy	93	0
Prodrug: 6-Ethoxy	77	0
Prodrug: 6-Methoxy	79	0
Prodrug: Aminal	84	0
Prodrug: Aminal	82	0
Prodrug: Dioxolenone	85	0

[00288] The masked property of isatoribine prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 9) show the amount of INFa released after exposure of the parent compound and its prodrugs for either 8 hours (val-isatoribine,

24) or 24 hours (other prodrugs) at the initial concentration of 100 μM. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of isotoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

Table 10: Masking of Loxoribine Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule: Loxoribine	17	50
Prodrug: 6-Ethoxy	45	0
Prodrug: Deoxy	43	0
Prodrug: Valyl ester	68	0

[00289] The masked property of loxoribine prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 10) show the amount of INFa released after exposure of the parent compound and its prodrugs for 24 hours at the initial concentration 100 μM. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of isotoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

Table 11: Masking of Imiquimod Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule: Imiquimod	31	60-76*
Prodrug: Pentyl carbamate	34	0
Prodrug: Ethyl carbamate	50	0

* Results of two experiments with three different donors

[00290] The masked property of imiquimod prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 11) show the amount of INFa released after exposure of the parent compound and its prodrugs for 24 hours at the initial

concentration 100 μM. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of isatoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

Table 12: Masking of Resiquimod Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule: Resiquimod	39	95 @ 1 μM
Prodrug: Ethyl Carbamate	38	9 @ 100 μM

[00291] The masked property of resiquimod prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 12) show the amount of INFa released after exposure of the parent compound and its prodrugs for 24 hours at the initial concentrations of either 1 or 100 μM. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of isatoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

Table 13: Masking of Bropirimine Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule: Bropirimine	35	22
Prodrug: Deoxy	48	0
Prodrug: Ethoxy	37	0
Prodrug: Ethyl carbamate	36	0
Prodrug: Pentyl carbamate	49	0

[00292] The masked property of bropirimine prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 13) show the amount of INFa released

after exposure of the parent compound and its prodrugs for 24 hours at the initial concentration of 100 μM. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of Isatoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

Table 14: Masking of Adenine Prodrugs

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Amount of INFa relative to that induced by isatoribine at 100 μM, %
Parent molecule	29	128 @ 0.1μM
Prodrug: Methoxy	65	0 @ 100 μM
Prodrug: Ethoxy	64	0 @ 10 μM
Prodrug: Deoxy	62	0 @ 0.1 μM
Prodrug: Ethyl carbonate	51	18 @ 32 μM
Prodrug: Pentyl carbonate	54	15 @ 10 μM

[00293] The masked property of adenine prodrugs can be demonstrated in a PBMC assay. The results of the PBMC assay (Table 14) show the amount of INFa released after exposure of the parent compound and its prodrugs for 24 hours at different initial concentrations specified in the table. The amount of the released INFa was normalized to that induced by 100 μM of isatoribine at 100 μM in the same blood donor with the same exposure time.

[00294] TLR7 ligand prodrugs can also be assessed *in vitro* for their conversion to the active parent TLR7 ligand. This can be measured by incubation of the prodrug in blood, plasma, or in a cell culture of hepatocytes. At selected time intervals, samples are taken to determine the amount of prodrug remaining and the amount of TLR7 ligand produced. Such determinations are readily made by use of analytical tools known in the art such as LC-MS. The determination of the extent of conversion of a masked TLR7 ligand prodrug to the parent TLR7 ligand is useful in interpreting data wherein masking is apparent at shorter times but diminishes upon long incubations in the PBMC assay described herein. The rate of conversion of the prodrug to the TLR7 ligand may be

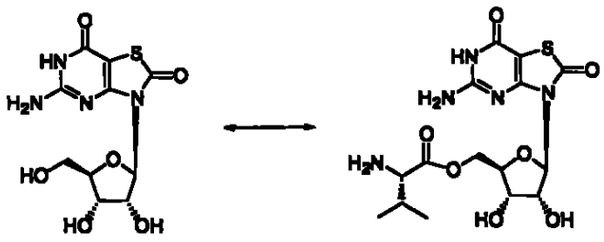
determined to ensure that the cytokine results arise predominately from exposure to prodrug rather than from exposure to TLR7 ligand generated by rapid conversion of the prodrug under the conditions of the experiment.

6.5 Biological Testing of TLR7 Ligand Prodrugs Demonstrating Increased Oral Availability and Decreased Side-Effects

Oral Availability

[00295] The improved bioavailability of TLR7 ligand prodrugs can be assessed by performing studies *in vivo*. In such experiments, the candidate prodrugs are administered by oral administration to mice, rats, monkeys, and/or dogs, and blood samples are taken at selected intervals. The blood samples are analysed for both the prodrug and the desired TLR7 ligand. Additional blood or liver samples may be analyzed for the presence of interferons and other cytokines that indicate functional activation of the TLR7 pathway *in vivo*. Desired candidates will demonstrate a blood exposure to the prodrug and also demonstrate a blood exposure to the desired TLR7 ligand of about 10% to 99% of the applied dose, as measured on a molar basis.

[00296] A representative example is the result obtained with the TLR7 ligand prodrug val-isatoribine (**24**), which as described below in the mouse and dog generated significant amounts of the parent TLR7 ligand isatoribine (**21**) in the blood. See U.S. Patent Application No. 10/305,061 (incorporated herein by reference in its entirety).



21 **24**

Interferon Alpha (Mu-IFN-α) Concentrations in Mice

[00297] The normal mouse provides a useful system for the assessment of the degree to which the inventions described herein provide material improvement in the oral delivery of **21** (isatoribine). Not only can one measure the plasma concentrations of isatoribine arising from oral administration of the said prodrug(s) but also the extensive immunological research conducted in the mouse has provided reagents suitable for measuring the levels of interferon alpha, a cytokine of interest reflecting one of the desired biologic activities of isatoribine.

[00298] We have used the murine system in a series of experiments that demonstrate that **24**, the 5'-valine ester of **21** (val-isatoribine) elicits an interferon response substantially improved over that resulting from administration of isatoribine itself.

[00299] Table 15 records the results of an assay for murine interferon alpha in the plasma of mice that were dosed two times with isatoribine, formulated in bicarbonate, at a level of 50 mg/kg by the oral route. It is evident that no interferon was measurable even when the dose was repeated after an interval of four hours.

Table 15: Interferon Alpha (Mu-IFN-α) Plasma Concentration (pg/mL) in Mice Following Two Oral 50 mg/kg Doses of Isatoribine 4 Hours Apart

Time, h	Individual Value			Mean	SD
First Dose					
0.00	BQL^{50}	BQL^{125}	BQL^{50}	0.00	0.00
0.03	BQL^{25}	BQL^{250}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.25	BQL^{50}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.50	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
1.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
1.50	BQL^{100}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
2.00	BQL^{25}	BQL^{75}	BQL^{25}	0.00	0.00
3.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
Second Dose					
4.03	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.25	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.50	BQL^{50}	$BQL^{37.5}$	BQL^{50}	0.00	0.00
5.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
5.50	$BQL^{37.5}$	$BQL^{37.5}$	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
6.00	BQL^{50}	$BQL^{41.3}$	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
7.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
8.00	BQL^{50}	BQL^{25}	BQL^{50}	0.00	0.00

BQL^{n} - Below Elevated Quantifiable Limit < n pg/mL.

[00300] Table 16 records the results of assays for murine interferon alpha in the plasma of mice that first were dosed with bicarbonate and then four hours later were dosed orally with isatoribine, formulated in bicarbonate, at a level of 50 mg/kg. Interferon was reported in the plasma from four mice, including two that had received the bicarbonate vehicle dose. All the values reported in this experiment were low, and the reported interferon levels were not consistently reported for all three mice assessed at each time point, suggesting that these signals may be artifacts arising from measurement near the

lower limits of the assay.

Table 16: Interferon Alpha (Mu-IFN-α) Plasma Concentration (pg/mL) in Mice Following One Vehicle Dose and One 50 mg/kg Doses of Isatoribine 4 Hours Later

Time, h	Individual Value			Mean	SD
First Dose					
0.00	BQL^{50}	BQL^{100}	$BQL^{62.5}$	0.00	0.00
0.03	BQL^{50}	BQL^{50}	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
0.08	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
0.25	BQL^{50}	$BQL^{62.5}$	BQL^{50}	0.00	0.00
0.50	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
1.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{100}	0.00	0.00
1.50	BQL^{50}	BQL^{100}	BQL^{50}	0.00	0.00
2.00	34.9	BQL^{25}	BQL^{25}	11.6	20.15
3.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	35.4	BQL^{100}	11.8	20.44
Second Dose					
4.03	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.25	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.50	BQL^{100}	BQL^{25}	133.2	44.4	76.90
5.00	74.9	BQL^{50}	NR	37.5	52.96
5.50	BQL^{250}	BQL^{75}	BQL^{25}	0.00	0.00
6.00	BQL^{25}	BQL^{75}	BQL^{75}	0.00	0.00
7.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{25}	0.00	0.00
8.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00

BQL^{a} - Below Elevated Quantifiable Limit < n pg/mL.

NR - Not reportable.

[00301] Table 17 records the results of assays for murine interferon alpha in the plasma of mice that were dosed orally with val-isatoribine, dissolved in bicarbonate, at a dose that is equivalent to 50 mg/kg of isatoribine on a molar basis. It is evident that interferon was readily measurable at 1.0 hour, 1.5 hours, and 2.0 hours after dosing. Interferon was detected in all mice assayed at a given time point, indicating the reliability of the effect following val-isatoribine administration. Thus a single administration of val-isatoribine was superior to either a single dose or a repeated dose of isatoribine.

Table 17: Plasma Concentration (pg/mL) of Interferon Alpha (Mu-IFN-α) in Mice Following a Single 73.0 mg/kg Dose of Val-Isatoribine

Time, h	Individual Value	Mean	SD

Time, h	Individual Value			Mean	SD
0.00	BQL	$BQL^{12.5}$	BQL^{25}	0.00	0.00
0.25	BQL	BQL	BQL	0.00	0.00
0.50	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL	0.00	0.00
0.75	BQL	BQL	BQL^{25}	0.00	0.00
1.00	173.2	125.1	89.0	129.1	42.24
1.50	202.9	145.9	294.8	214.5	75.13
2.00	49.2	137.9	138.3	108.5	51.33
3.00	BQL^{25}	NR	NR	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	27.6	BQL	9.20	15.90
5.00	BQL	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00

BQL - Below the Quantifiable Limit < 12.5 pg/mL

BQL^{n} - Below the Elevated Quantifiable Limit < n pg/mL

NR - Not Reportable

[00302] The data tabulated in Tables 15, 16, and 17 may be also considered from the point of view of the incidence of measurable interferon levels. Interferon was detected in the plasma of only 4 of the 114 mice used in the studies of isatoribine, whereas 10 of the 30 mice dosed with val-isatoribine had detectable interferon in their plasma. Thus, the prodrug increased the proportion of mice exhibiting an interferon response from 4% to 30 % and the magnitude of both the average and peak response was increased twofold (100%).

[00303] In other experiments, plasma levels of isatoribine and interferon alpha were measured in mice that were dosed with isatoribine by the intravenous route, and these levels were compared to the levels of isatoribine and interferon alpha arising after oral administration of val-isatoribine. These data are summarized in Figure 1. In this figure it is evident that the levels of interferon alpha induced by oral val-isatoribine ("val-isator") (at 50 mg/kg isatoribine molar equivalent) was similar to that from intravenous isatoribine ("isator") at 25 mg/kg. Thus, oral val-isatoribine provides levels of isatoribine and interferon that are approximately 50% of those observed after intravenous administration of isatoribine itself.

Beagle Dog

[00304] The effect of a prodrug (val-isatoribine, 24) on the systemic exposure to isatoribine (21) after oral administration to beagle dogs was investigated. Isatoribine was prepared in sodium bicarbonate solution. Val-isatoribine and isatoribine were prepared as the following formulations, which were chosen to ensure solubility:

[00305] Formulation 1: Isatoribine in sodium bicarbonate solution, 1 and 4 mg/mL.

[00306] Formulation 2: Val-isatoribine in phosphate buffered saline, 1.62 and 6.48 mg/mL, equivalent to 1 and 4 mg/mL of isatoribine on a molar basis.

[00307] Four male and four female adult beagle dogs weighing between 15 to 27 kg and approximately 1-2 years old were used at the beginning of the study. The animals were divided into 2 groups of 2 males and 2 females each. The test material was administered by gavage on Days 1 and 8, allowing a 7 day washout period between administrations. Blood samples (2 mL) were collected from each animal at predose, 15, 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 hours into lithium heparin tubes after each dosing. The plasma was frozen at –70 °C until analysis. The plasma was analyzed for isatoribine by an HPLC-MS/MS assay.

[00308] The pharmacokinetic parameters for isatoribine arising from isatoribine or val-isatoribine in each dog are summarized in Tables 18 and 19. The ratios for the key pharmacokinetic parameters defining the maximum concentration (Cmax) and total exposure as measured by the area under the time-concentration curve (AUC) for the prodrug and the bicarbonate solution at the 50 mg/kg dose are summarized in Table 20. For the prodrug **24**, the Cmax ratio was 2.98 ± 0.695 and the AUC ratio was 2.38 ± 0.485. These results indicate that at 50 mg/kg dose, the prodrug val-isatoribine provided substantially higher Cmax and greater bioavailability than isatoribine in bicarbonate solution.

[00309] The ratios for the Cmax and AUC for the prodrug to the bicarbonate solution for the 10 mg/kg dose are summarized in Table 21. For the prodrug, the Cmax ratio was 2.24 ± 0.249 and the AUC ratio was 1.82 ± 0.529. These results indicate that at 10 mg/kg dose, the prodrug val-isatoribine provided higher Cmax and greater bioavailability than isatoribine in bicarbonate solution.

[00310] Thus, the maximum concentrations of isatoribine achieved after oral dosing are at least doubled, and the systemic exposure to isatoribine is enhanced by approximately 2-fold following oral administration of the prodrug val- isatoribine, compared to isatoribine itself, at both 10 and 50 mg/kg dose.

Table 18: Pharmacokinetic Parameters of Isatoribine in Dogs dosed at 50 mg/kg

	Dosing Period	1	2
	Formulation	Isatoribine	Val-isatoribine
Animal Number	Dose, mg/kg molar equivalent isatoribine	50	50

Dog 3517322	Cmax, ng/mL	3038.7	11741.5
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	15227.0	33038.1
	T1/2, h	6.4	2.4
Dog 3521451	Cmax, ng/mL	3354.0	10652.1
	Tmax, h	1.00	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	9422.2	26552.7
	$T_{1/2}$, h	1.9	1.6
Dog 3528707	Cmax, ng/mL	8915.3	20340.6
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	29701.7	53273.0
	$T_{1/2}$, h	2.2	2.3
Dog 3532828	Cmax, ng/mL	6134.7	15987.9
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	12069.7	32987.0
	$T_{1/2}$, h	1.4	1.6

Table 19: Pharmacokinetic Parameters of Isatoribine in Dogs Dosed at 10 mg/kg

	Dosing Period	1	2
	Formulation	Isatoribine	Val-isatoribine
Animal Number	Dose, mg/kg molar equivalent isatoribine	10	10
Dog 3524523	Cmax, ng/mL	4091.5	8594.6
	Tmax, h	1.00	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	13305.8	17166.2
	$T_{1/2}$, h	2.1	1.7

Dog 3526402	Cmax, ng/mL	1859.5	4047.0
	Tmax, h	1.00	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	5774.4	10548.9
	$T_{1/2}$, h	1.6	2.2
Dog 357450	Cmax, ng/mL	1620.3	4228.7
	Tmax, h	0.50	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	4387.3	11158.0
	$T_{1/2}$, h	1.5	2.3
Dog 354708	Cmax, ng/mL	2781.2	5784.8
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	7522.1	12259.1
	$T_{1/2}$, h	1.6	2.0

Table 20: Ratio of Pharmacokinetic Parameters of Isatoribine in Dogs Dosed at 50 mg/kg

Animal Number	Formulation	Isatoribine	Val-isatoribine
Dog 3517322	Cmax Ratio	1.00	3.86
	AUC Ratio	1.00	2.17
Dog 3521451	Cmax Ratio	1.00	3.18
	AUC Ratio	1.00	2.82
Dog 3528707	Cmax Ratio	1.00	2.28
	AUC Ratio	1.00	1.79
Dog 3532828	Cmax Ratio	1.00	2.61
	AUC Ratio	1.00	2.73
	Mean Cmax Ratio	N/A	2.98

	SD Cmax Ratio	N/A	0.695
	Mean AUC Ratio	N/A	2.38
	SD AUC Ratio	N/A	0.485

Table 21: Ratio of Pharmacokinetic Parameters of Isatoribine in Dogs Dosed at 10 mg/kg

Animal Number	Formulation	Isatoribine	Val-isatoribine
Dog 3524523	Cmax Ratio	1.00	2.10
	AUC Ratio	1.00	1.29
Dog 3526402	Cmax Ratio	1.00	2.18
	AUC Ratio	1.00	2.20
Dog 3527450	Cmax Ratio	1.00	2.61
	AUC Ratio	1.00	2.54
Dog 355708	Cmax Ratio	1.00	2.08
	AUC Ratio	1.00	1.63
	Mean Cmax Ratio	N/A	2.24
	SD Cmax Ratio	N/A	0.249
	Mean AUC Ratio	N/A	1.82
	SD AUC Ratio	N/A	0.529

[00311] The prodrug val-isatoribine is preferred for several reasons. First, the prodrug is easily formulated to provide a high proportion of active agent. This results in small capsule sizes for a given dose, which is an advantage for an oral product. Second, at the doses tested, val-isatoribine provides plasma levels of isatoribine that are well within the range desirable for biologic effect after oral administration, which is not the case for isatoribine itself.

Cynomolgus Monkey

[00312] From two to four male or female cynomolgus monkeys were used on the animal testing study. The study compound was formulated in a vehicle appropriate for animal oral or intravenous administration. The vehicles used were either as aqueous buffers or a solutions containing Cremophor. Animals were dosed via oral gavage or intravenous bolus injection for each test article. Blood samples (approximately 0.5 mL) were collected at predetermined time points (usually, pre-dose, 15, 30, and 45 minutes and at 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 8 and 24 hours post-dose), placed into tubes containing disodium EDTA. The samples were placed on wet ice following collection, and plasma separated as rapidly as possible. The plasma samples were aliquoted into a single vial, and stored frozen at approximately -20°C until shipped on dry ice to the Sponsor. Animals were given food and water approximately 4 hours after the dose.

[00313] The plasma samples were analyzed for a prodrug and a parent compound using well-known LCMS/MS quantitation techniques by triple quadrupole instruments, i.e Sciex API3000. The quantitation results for the parent compound delivered by oral administration of the parent compound itself or by its prodrug administered orally were used to calculate the area-under-the-cureve (AUC) values from time zeto to 24 hours (PO AUC0-24h). The comparison of the AUC values for the parent compound delivered into systemic circulation with that delivered by the prodrug allowed calculating relative oral bioavalibility of the prodrug. See results provided in Tables 22-26. When the AUC data for the parent compound delivered by the parent compound itself after its intravenous administration were available (AUC IV), it allowed calculating the absolute oral bioavailability by deviding the PO AUC (0-24h) for the prodrug by the IV AUC (0-24h) for the parent moleclule.

Table 22: Oral bioavailability of Isatoribine and its Prodrugs in Monkeys

Parent molecule and its prodrugs	Structure	Oral bioavailability in cynomolgus monkey, %
Parent molecule: Isatoribine	21	3
Prodrug: Amino acid ester	24	7-9*
Prodrug: Deoxy	93	80
Prodrug: 6-Ethoxy	77	28

Prodrug: 6-Methoxy	79	21
Prodrug: Aminal	84	14
Prodrug: Aminal	82	4
Prodrug: Dioxolenone	85	17

Average of multiple experiments at different doses.

Table 23: Oral bioavailability of Loxoribine and its Prodrugs in Monkeys

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Oral bioavailability in cynomolgus monkey, %
Parent molecule: Loxoribine	17	2
Prodrug: 6-Ethoxy	45	9
Prodrug: Deoxy	43	13

Table 24: Oral bioavailability of Imiquimod and its Prodrugs in Monkeys

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Oral bioavailability in cynomolgus monkey, %
Parent molecule: Imiquimod	31	100 AUC(0-24h) = 9.0
Prodrug: Pentyl carbamate	34	555 AUC(0-24h) = 50
Prodrug: Ethyl carbamate	50	234 AUC(0-24h) = 21.1

Table 25: Oral bioavailability of Bropirimine and its Prodrugs in Monkeys

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Oral bioavailability in cynomolgus monkey, %
Parent molecule: Bropirimine	35	100
Prodrug: Deoxy	48	137*
Prodrug: Ethoxy	37	94
Prodrug: Ethyl carbamate	36	33
Prodrug: Pentyl carbamate	49	6

* The oral bioavailability exceeding 100% may be associated with gender differences since the parent compound was studied in male monkeys and the prodrug was studied in female monkeys.

Table 26: Oral bioavailability of Adenine Prodrugs in Monkeys

Parent molecule and its prodrugs	Compound No.	Oral bioavailability in cynomolgus monkey, %
Parent molecule:	29	46
Prodrug: Methoxy	65	1.3
Prodrug: Ethoxy	64	4.6
Prodrug: Deoxy	62	0.7
Prodrug: Pentyl carbonate	54	9.7

Reduction of Gastrointestinal Irritancy

[00314] TLR7 ligand prodrugs of the invention also demonstrate unexpected and greatly reduced toxicology effects, and in particular reduced GI irritancy.

[00315] The gastrointestinal ("GI") tract is lined with substantial immune tissue (e.g., Peyer's patches, etc.). TLR7 ligand prodrugs offer the prospect of masking the active structure as the agent passes through lymphoid tissue lining the gut, which should minimize activation of this tissue and thereby reduce GI irritancy.

[00316] Robins *et al.* have shown that elimination of the 5'-hydroxyl of isatoribine nucleoside eliminates activity. *See* Robins *et al.*, *Adv. Enzyme Regul.*, 29, 97-121 (1989). Without being limited to any particular theory, it was hypothesized that blockade of this hydroxyl site by an ester substitution would similarly eliminate activity but allow transport in the systemic circulation, where the valine ester would be cleaved and result in exposure to isatoribine.

[00317] We have found that the hypothesis was confirmed. Formal toxicology studies of intravenously administered isatoribine and orally administered isatoribine and val- isatoribine were conducted in beagle dogs. The toxicology results for orally administered isatoribine are from a study conducted by ICN/Nucleic Acid Research Institute.

[00318] We compared in the dog the oral toxicology of 21 and 24, and the intravenous toxicology of 21. We observed that the oral toxicology of 24 was much more like intravenous 21 than it was like oral 21. In particular, the dose limiting toxicology of

oral 3 was similar in nature to that of intravenous 21, and occurred at blood exposures that were similar to those observed after intravenous 21. In contrast, oral 21 had a different limiting toxicity (gastrointestinal lesions) and this toxicity was observed at a dose lower than the toxic dose of either intravenous 21 or oral 24. Also, emesis was observed in dogs treated with oral 21 at doses lower than the dose of oral 24 that resulted in emesis. *See* Table 27. Other systems for assessment of emesis also are known, such as in ferrets, allowing comparison of oral and intravenous administration of compounds. *See, e.g.,* Strominger N. *et al.*, *Brain Res. Bull*, 5, 445-451 (2001).

[00319] In each case the compound was administered as a solution, by gavage or by intravenous infusion. Multiple parameters were assessed, as is customary in a toxicology study. In the studies providing higher potential exposure to isatoribine, the plasma concentration of isatoribine was assessed by a LC/MS method. The notable GI findings were graded and are listed in Table 27.

TABLE 27: Effect on GI Tolerance in Dogs after Dosing of Isatoribine (21) or Val-Isatoribine (24) Ranked by Systemic Exposure (AUC) to Isatoribine in Toxicology Studies.

		Oral Isatoribine		IV Isatoribine		Oral Val-Isatoribine	
Isatoribine equivalent applied dose (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}24\ hrs}$ (μg•hr/ml)	Emesis or loose stool	GI lesions or Irritation	Emesis or loose stool	GI lesions or irritation	Emesis or loose stool	GI lesions or irritation
2.5	n.d	Neg.	Neg.				
5	n.d.	+	Neg.				
10	n.d.	++	++				
8.1	11.4					Neg.	Neg.
16	15.6					Neg.	Neg.
12.5	19.5			Neg.	Neg.		
32	31.7					Neg.	Neg.
25	42.8			Neg.	Neg.		
64	71					Neg.	Neg.
130	75.3					+	Neg.
50	87.8			+	Neg.		
260	127					++	Neg.
390	180					+++	Neg.

		Oral Isatoribine		IV Isatoribine		Oral Val-Isatoribine	
100	209			++	Neg.		

[00320] For orally administered isatoribine the principal findings were related to GI tolerability as measured by GI irritancy. The clinical signs noted in Table 27 were emesis and/or loose stools. These clinical signs were more frequent in the 10 mg/kg group, and in one animal at this dose a bloody stool was noted. Gross histopathologic evaluation of the GI tract noted multiple, scattered red lesions on the intestinal mucosa in four of eight dogs at 10 mg/kg, which on microscopic evaluation revealed cellular congestion and hemorrhage, as might be expected for an ongoing localized inflammatory process. The GI effects established the NOAEL as 5 mg/kg.

[00321] Intravenously administered isatoribine resulted in emesis and/or loose stools as a common finding in dogs; this effect occurred at substantially higher applied doses than orally administered isatoribine. No lesions were seen in the GI tract either at necropsy or histopathologic evaluation of tissues. The GI toxicity did not affect the NOAEL, which was established as 12.5 mg/kg on the basis of other findings.

[00322] Orally administered val-isatoribine demonstrated a toxicology profile similar to intravenously administered isatoribine. At higher applied doses, emesis and loose stools were observed. No GI lesions were found, although this was a focus of evaluation in this study. As for intravenously administered isatoribine, the NOAEL was established on the basis of other findings. The correspondence of observed toxicity to systemic exposures of isatoribine is of interest in this study; the threshold of isatoribine AUC for observation of emesis and loose stools is similar for intravenously administered isatoribine and orally administered val-isatoribine (Table 27).

[00323] The data in Table 27 indicate that orally administered val-isatoribine provides an improved toxicity profile over orally administered isatoribine, and is consistent with the hypothesis that chemical masking of the activity of isatoribine is afforded by chemically substituting an ester at the 5'-hydroxyl position of the nucleoside. As illustrated in Tables 9 through 14, it is possible to chemically mask any TLR7 ligand using a variety of substituents. Engineering this substitution to be cleavable upon entry into the body affords systemic exposure to the useful activity of the compound without the limiting GI toxicity arising from the anatomical structure of the GI tract. As illustrated in Tables 22 through 25, it is possible to design the chemical substitution on a masked TLR7 ligand to be cleavable after administration. Thus, masked TLR7 ligand prodrugs can be generated for any TLR7 ligand. This enables administration of doses that are substantially higher on

a molar basis than otherwise would be acceptable, with the result of greater efficacy and reduced side effects when compared to administration of the parental "unmasked" compound alone.

6.6 Oral Composition

[00324] Table 28 illustrates a batch formulation and a single dose unit formulation containing 100 mg of val-isatoribine.

Table 28: Formulation for 100 mg tablet

Material	Percent by Weight	Quantity (mg/tablet)	Quantity (kg/batch)
val-isatoribine	40%	100.00	20.00
Microcrystalline Cellulose, NF	53.5%	133.75	26.75
Pluronic F-68 Surfactant	4.0%	10.00	2.00
Croscarmellose Sodium Type A, NF	2.0%	5.00	1.00
Magnesium Stearate, NF	0.5%	1.25	0.25
Total	100.0%	250.00 mg	50.00 kg

[00325] The microcrystalline cellulose, croscarmellose sodium, and val-isatoribine components are passed through a #30 mesh screen (about 430μ to about 655μ). The Pluronic F-68® (manufactured by JRH Biosciences, Inc. of Lenexa, KS) surfactant is passed through a #20 mesh screen (about 457μ to about 1041μ). The Pluronic F-68® surfactant and 0.5 kgs of croscarmellose sodium are loaded into a 16 qt. twin shell tumble blender and are mixed for about 5 minutes. The mix is then transferred to a 3 cubic foot twin shell tumble blender where the microcrystalline cellulose is added and blended for about 5 minutes. The thalidomide is added and blended for an additional 25 minutes. This pre-blend is passed through a roller compactor with a hammer mill attached at the discharge of the roller compactor and moved back to the tumble blender. The remaining croscarmellose sodium and magnesium stearate is added to the tumble blender and blended for about 3 minutes. The final mixture is compressed on a rotary tablet press with 250 mg per tablet (200,000 tablet batch size).

6.7 Mucosal Composition

[00326] A concentrate is prepared by combining isatoribine, and a 12.6 kg portion of the trichloromonofluoromethane in a sealed stainless steel vessel equipped with a high

shear mixer. Mixing is carried out for about 20 minutes. The bulk suspension is then prepared in the sealed vessel by combining the concentrate with the balance of the propellants in a bulk product tank that is temperature controlled to 21° to 27°C. and pressure controlled to 2.8 to
4.0 BAR. 17 ml aerosol containers which have a metered valve which is designed to provide 100 inhalations of the composition of the invention. Each container is provided with the following:

val-isatoribine	0.0120 g
trichloromonofluoromethane	1.6960 g
dichlorodifluoromethane	3.7028g
dichlorotetrafluoroethane	1.5766 g
total	7.0000 g

6.8 Intravenous Composition

[00327] The intravenous formulation is prepared by reconstituting a compound of the invention with an appropriate liquid medium, such as water for injection (WFI) or a 5% dextrose solution. A desired concentration of the intravenous formulation can be obtained by reconstituting an appropriate amount of a compound of the invention with an appropriate volume of liquid medium. A desired concentration of the intravenous formulation provides a therapeutically effective amount of a compound of the invention to the patient, preferably a mammal, more preferably a human, in need of the intravenous pharmaceutical formulation and maintains a therapeutically effective level of a compound of the invention in the patient. The dose which is therapeutically effective will depend on the rate at which the intravenous formulation is delivered to the patient and the concentration of the intravenous formulation.

[00328] For example, one vial containing a composition (e.g., 50 mg of a compound of the invention per vial) are reconstituted with a 5% dextrose solution (14 ml of 5% dextrose solution per vial) yielding a total of 25 mL of solution. The reconstituted solution is incorporated into a dextrose solution in an infusion bag and q.s. to 50 mL, resulting in a solution containing 1 mg/ml of a compound of the invention suitable for intravenous infusion administration. The preferred concentration of a compound of the invention in the

liquid medium, in the infusion bag, is about 0.001 to about 3 mg/ml, preferably about 0.75 to about 1 mg/ml.

[00329] The foregoing has demonstrated the pertinent and important features of the present invention. Many modifications and variations of the present invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific embodiments described herein are offered by way of example only, and the invention is to be limited only by the terms of the appended claims along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

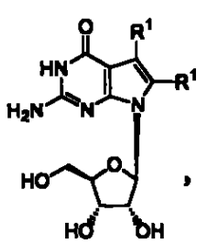
[00330] All references cited herein are incorporated herein by reference in their entirety and for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety for all purposes.

What is claimed is:

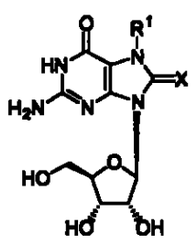
1. A method of treating a hepatitis C virus infection in a patient comprising administering to the patient in need thereof a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof.

2. A method of treating a hepatitis C virus infection in a patient comprising administering to the patient in need thereof a therapeutically or prophylactically effective amount of a TLR7 ligand or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof, wherein the TLR7 ligand is selected from analogs and derivatives of guanosine, imidazoquinoline, adenine, and pyrimidine.

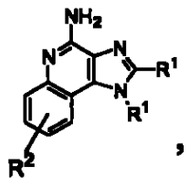
3. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is selected from



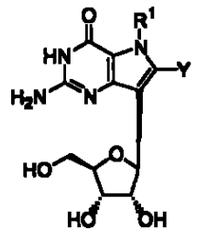
Ia ,



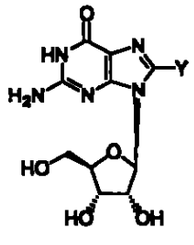
Ib ,



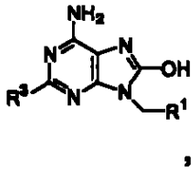
Ic ,



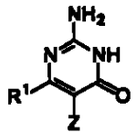
Id ,



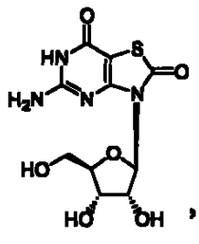
Ie ,



If ,



Ig , and



Ih ,

wherein:

each R^1 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted aryl or heteroaryl;

R^2 is H, OH, SH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), aryl, or heteroaryl;

R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), -NH(alkyl), -NH(aryl), -NH(heteroaryl), -NH(R4)(alkyl), -NH(R^4)(aryl), or -NH(R^4)(heteroaryl), wherein R^4 is a substituted or unsubstituted alkyl;

X is O or S;

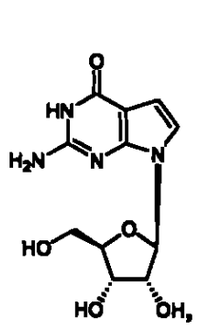
Y is H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, or a substituted or unsubstituted alkyl or aryl;

Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4;

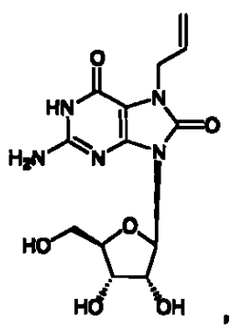
or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

4. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is selected from Formula Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, and Ih, wherein R^1 is H or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl; R^2 is H, OH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, or –CH_2-O-(alkyl); R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -S-(alkyl), or -NH(alkyl); X is O or S; Y is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4; and Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4.

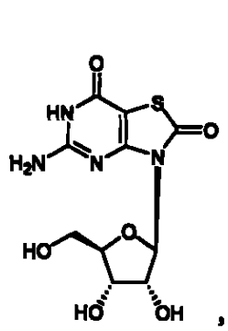
5. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is selected from



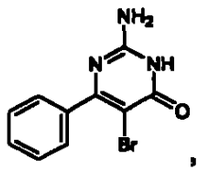
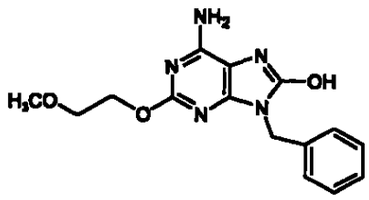
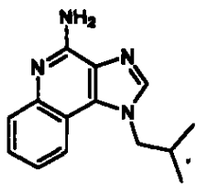
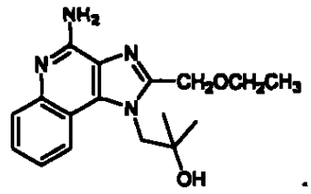
,



,



,




, and


6. The method of claim 2 wherein the patient is human.

7. The method of claim 2 further comprising administering a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

8. The method of claim 2 further comprising administering an additional therapeutic agent.

9. The method of claim 8 wherein the additional therapeutic agent is an antiviral agent.

10. The method of claim 2 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is 0.001 to 100 mg/kg per day.

11. The method of claim 10 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 0.01 to 50 mg/kg per day.

12. The method of claim 11 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 0.1 to 20 mg/kg per day.

13. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is administered parenterally.

14. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is administered intravenously.

15. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is administered orally.

16. The method of claim 2 wherein the TLR7 ligand is administered mucosally.

17. A method of treating a hepatitis C virus infection in a patient comprising orally administering to the patient in need thereof a TLR7 ligand prodrug or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof, wherein the oral administration of the TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the TLR7 ligand while reducing undesirable side effects associated with oral administration of TLR7 ligands.

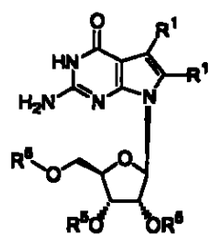
18. A method of treating a hepatitis C virus infection in a patient comprising orally administering to the patient in need thereof a masked TLR7 ligand prodrug or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, or stereoisomer thereof, wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the TLR7 ligand while reducing undesirable side effects associated with oral administration of TLR7 ligands.

19. The method of claim 18 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is selected from analogs and derivatives of guanosine, imidazoquinoline, adenine, and pyrimidine.

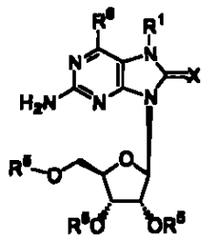
20. The method of claim 19 wherein the prodrug is an (a) amide, carbamate, or amidine moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, carbonate, carbamate, ether, imidate, acetal, aminal, or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, (c) acetal or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand keto substituent, (d) imidate moiety after conversion of a TLR7 ligand carbonyl of an amido substituent, (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine, or (f) amine.

21. The method of claim 20 wherein the prodrug is selected from an (a) carbamate moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, ether, or aminal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, or (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine.

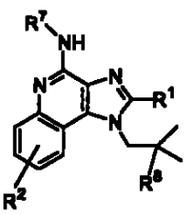
22. The method of claim 18 wherein the prodrug of the masked TLR7 ligand is selected from



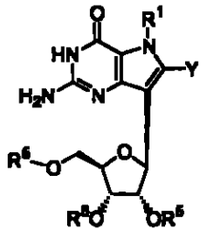
IIa ,



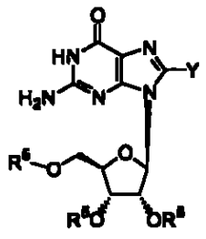
IIb ,



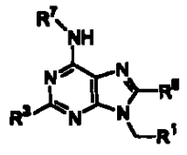
IIc ,



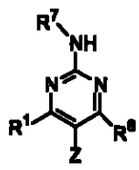
IId ,



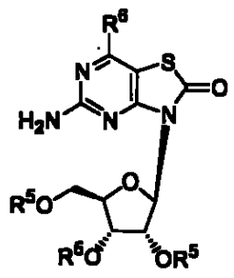
IIe ,



IIf ,



IIg , and



IIh ,

wherein:

each R^1 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted aryl or heteroaryl;

R^2 is H, OH, SH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), aryl, or heteroaryl;

R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), -NH(alkyl), -NH(aryl), -NH(heteroaryl), -NH(R^4)(alkyl), -NH(R^4)(aryl), or -NH(R^4)(heteroaryl);

R^4 is a substituted or unsubstituted alkyl;

R^5 is independently H, –C(O)(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group

$-C(O)CHNH_2R^9$;

R^6 is H, OR^{10}, or $N(R^{11})_2$;

R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted $-C(O)(C_{1-18}alkyl)$ or $-C(O)_2(C_{1-18}alkyl)$;

R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), $-OCO_2(C_{1-18}alkyl)$, $-OC(O)(C_{1-18}alkyl)$, or a racemic, L-, or D-amino acid group $-OC(O)CHNH_2R^1$;

R^9 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, $C(O)CH(C_{1-6}$ alkyl$)NH_2$, or $-C(O)CH(CH_2$-aryl$)NH_2$;

R^{10} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, $-(CR^{12}R^{13})_t(C_6-C_{10}$ aryl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_3-C_{10}$ cycloalkyl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_4-C_{10}$ heterocyclic), $-(CR^{12}R^{13})_{t>1}OH$, $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}CO_2C_{1-18}$ alkyl, and $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alkyl, and SO_2(aryl), wherein t is an integer from 0 to 6 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, cycloalkyl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, $-NH_2$, -NH-alkyl, $-N(alkyl)_2$, -NH-aryl, -N(alkyl)(aryl), $-N(aryl)_2$, -NHCHO, -NHC(O)alkyl, -NHC(O)aryl, -N(alkyl)C(O)H, -N(alkyl)C(O)alkyl, -N(aryl)C(O)H, -N(aryl)C(O)alkyl, $-NHCO_2$alkyl, $-N(alkyl)CO_2$alkyl, $-NHC(O)NH_2$, $-N(alkyl)C(O)NH_2$, -NHC(O)NH-alkyl, -NHC(O) $N(alkyl)_2$, -N(alkyl)C(O)NH-alkyl, N(alkyl)C(O) $N(alkyl)_2$, $-NHSO_2$-alkyl, $-N(alkyl)SO_2$-alkyl, -C(O)alkyl, -C(O)aryl, -OC(O)alkyl, -OC(O)aryl, $-CO_2$-alkyl, $-CO_2$-aryl, $-CO_2H$, $-C(O)NH_2$, -C(O)NH-alkyl, $-C(O)N(alkyl)_2$, -C(O)NH-aryl, $-C(O)N(aryl)_2$, -C(O)N(alkyl)(aryl), -S(O)alkyl, -S(O)aryl, $-SO_2$alkyl, $-SO_2$aryl, $-SO_2NH_2$, $-SO_2$NH-alkyl, and $-SO_2N(alkyl)_2$;

R^{11} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_3-C_{10} cycloalkyl, or together with nitrogen forms a 5- or 6-membered heterocyclic ring;

R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, or C_{2-6} alkynyl;

R^{14} is H, C_{1-6} alkyl, or $-CH_2$-aryl;

X is O or S;

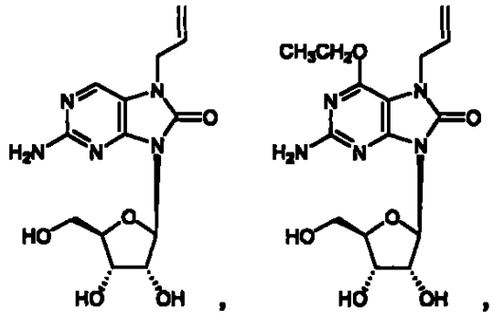
Y is H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, NH_2, NHR^4, $N(R^4)_2$, or a substituted or unsubstituted alkyl or aryl; and

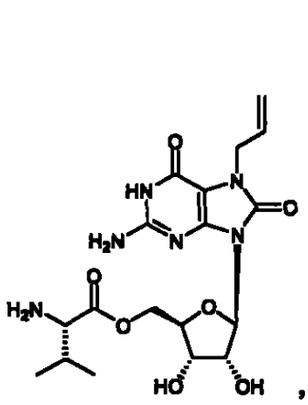
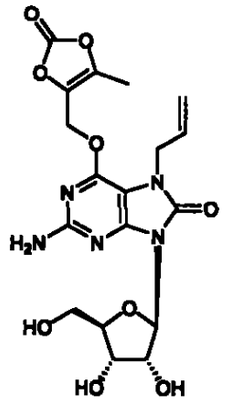
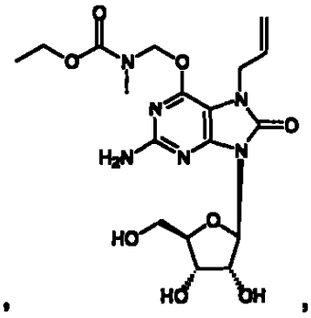
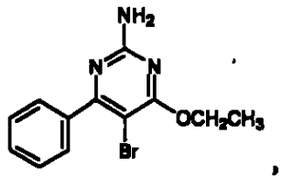
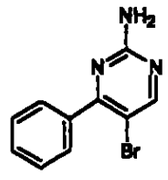
Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4;

or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

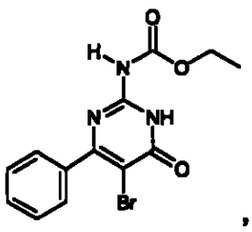
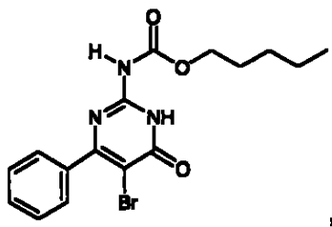
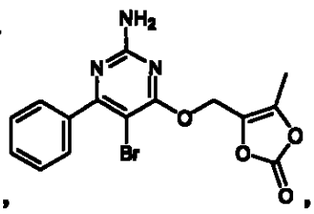
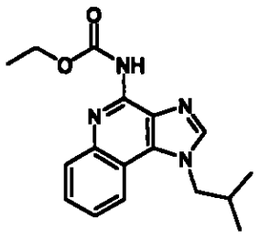
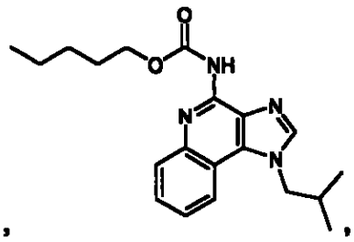
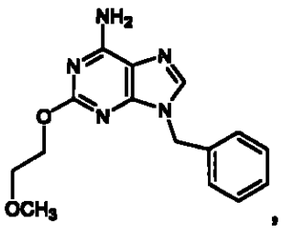
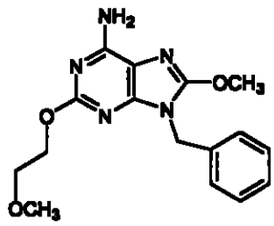
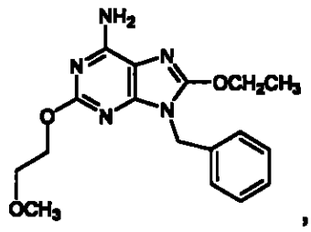
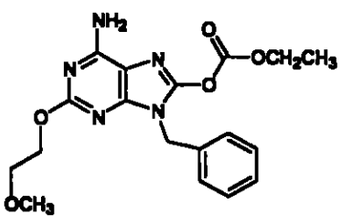
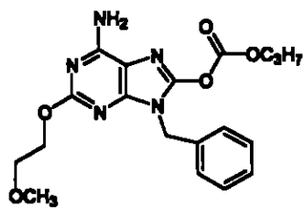
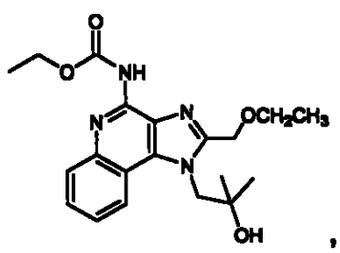
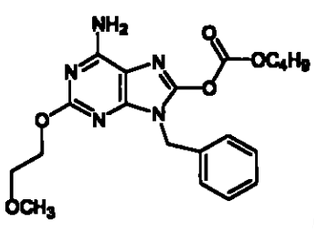
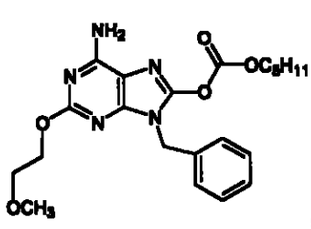
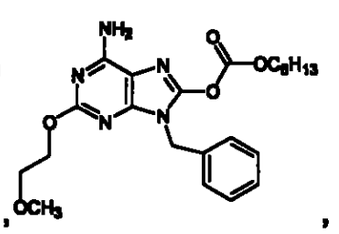
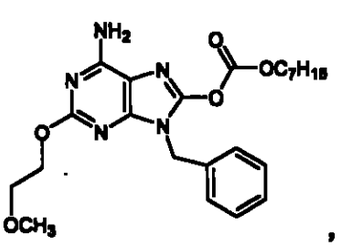
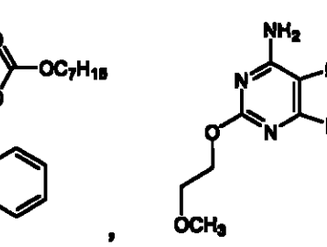
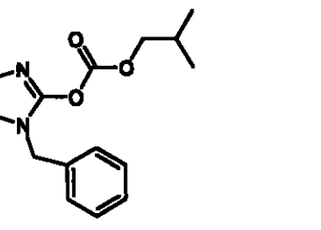
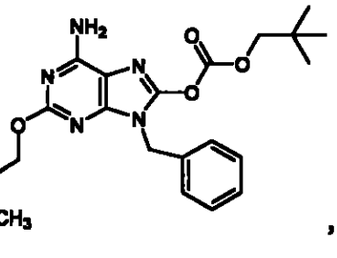
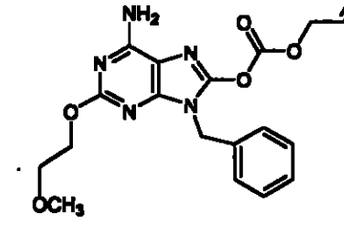
23. The method of claim 22 wherein R^1 is H or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl; R^2 is H, OH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, or $-CH_2$-O-(alkyl); R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -S-(alkyl), or -NH(alkyl); R^5 is independently H, $-C(O)(C_{1-18}$alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group $-C(O)CHNH_2R^9$, wherein R^9 is an unsubstituted alkyl; R^6 is H or OR^{10}, wherein R^{10} is independently C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, $-(CR^{12}R^{13})_t(C_6$-C_{10} aryl), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_4$-C_{10} heterocyclic), and $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alkyl, wherein t is an integer from 0 to 4 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, aryl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with 1 to 3 substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, $-CO_2$-alkyl, $-CO_2$-aryl, -OC(O)alkyl, and -OC(O)aryl, and wherein R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, or C_{2-6} alkenyl; and R^{14} is H, $-CH_3$, or $-CH_2CH_3$; R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted $-C(O)(C_{1-18}$alkyl) or $-C(O)_2(C_{1-18}$alkyl); R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), $-OCO_2(C_{1-18}$alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group $-OC(O)CHNH_2R^1$; X is O or S; Y is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4; and Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4.

24. The method of claim 18 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is selected from


,

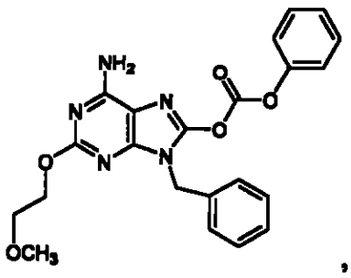
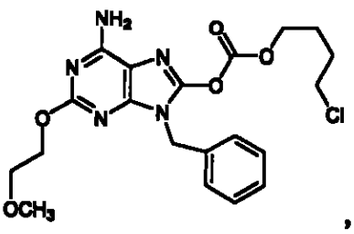
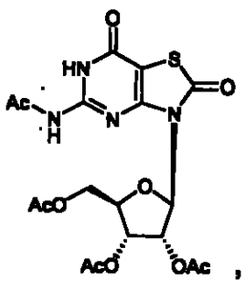
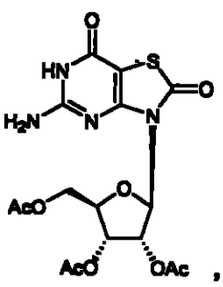
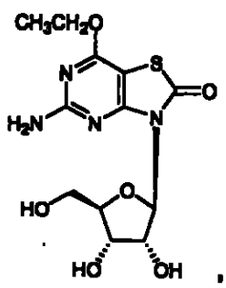
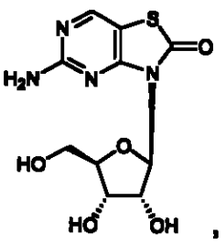
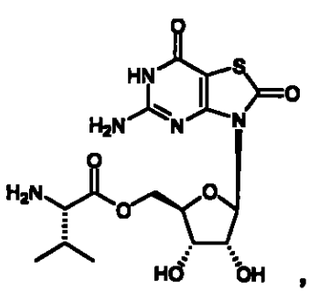
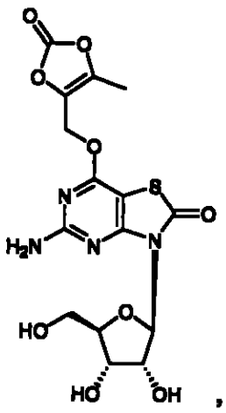
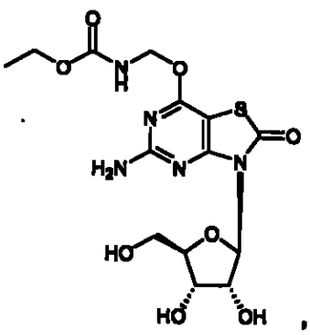
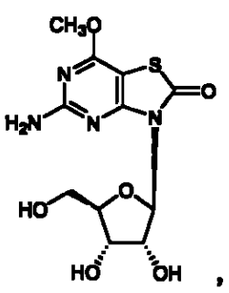
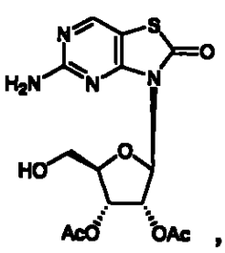
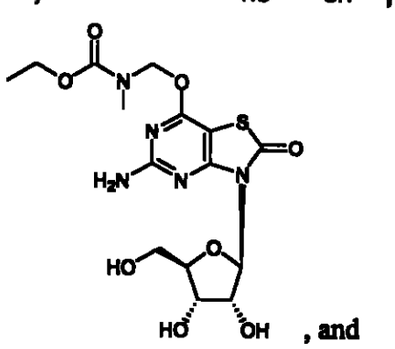
,

,

,

,

,

,

~~27~~ 124


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

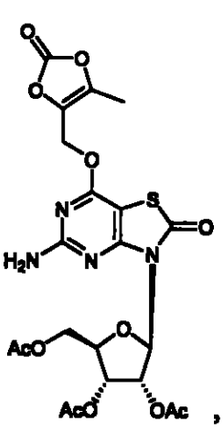
,

,

,

,

,

, and

,

25. The method of claim 18 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves an *in vivo* effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 10% to 500% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

26. The method of claim 18 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves an *in vivo* effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 50% to 200% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

27. The method of claim 25 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the corresponding TLR7 ligand without causing gastrointestinal irritation.

28. The method of claim 18 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug reduces undesirable side effects in a patient relative to the side effects upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

29. The method of claim 18 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug reduces undesirable side effects by 50% in a patient relative to the side effects upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

30. The method of claim 18 wherein the side effect is gastrointestinal irritancy.

31. The method of claim 30 wherein the irritancy is hemorrhage.

32. The method of claim 30 wherein the irritancy is lesions.

33. The method of claim 30 wherein the irritancy is emesis.

34. The method of claim 18 wherein the patient is human.

35. The method of claim 18 further comprising administering a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

36. The method of claim 18 further comprising administering an additional therapeutic agent.

37. The method of claim 36 wherein the additional therapeutic agent is an antiviral agent.

38. The method of claim 18 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is 0.001 to 100 mg/kg per day.

39. The method of claim 38 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 0.1 to 25 mg/kg per day.

40. The method of claim 39 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 1 to 20 mg/kg per day.

41. The method of claim 18 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered parenterally.

42. The method of claim 41 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered intravenously.

43. The method of claim 18 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered orally.

44. The method of claim 18 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered mucosally.

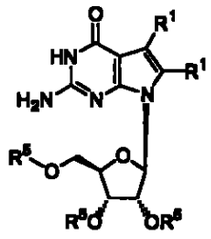
45. A method for treating diseases responsive to immuno therapy while reducing undesirable side effects associated with immunologic agents, comprising orally administering a masked TLR7 ligand prodrug to a patient in need of immuno therapy, wherein the masked TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of a TLR7 ligand in the patient.

46. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is selected from analogs and derivatives of guanosine, imidazoquinoline, adenine, and pyrimidine.

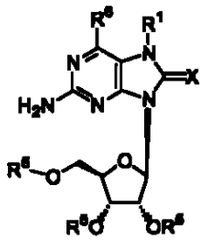
47. The method of claim 45 wherein the prodrug is an (a) amide, carbamate, or amidine moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, carbonate, carbamate, ether, imidate, acetal, aminal, or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, (c) acetal or ketal moiety after conversion of a TLR7 ligand keto substituent, (d) imidate moiety after conversion of a TLR7 ligand carbonyl of an amido substituent, (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine, or (f) amine.

48. The method of claim 47 wherein the prodrug is selected from an (a) carbamate moiety after conversion of a TLR7 ligand amine substituent, (b) ester, ether, or aminal moiety after conversion of a TLR7 ligand alcohol substituent, or (e) deoxygenated moiety after conversion of a TLR7 ligand oxo substituent of pyrimidine or guanosine.

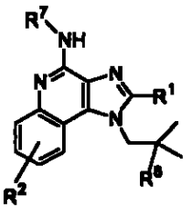
49. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is selected from



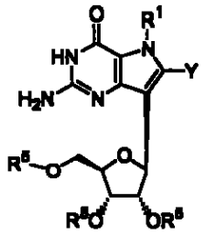
IIa ,



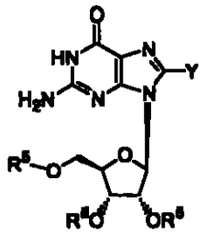
IIb ,



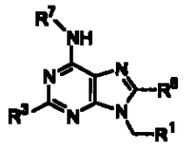
IIc ,



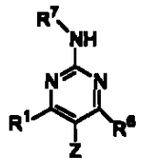
IId ,



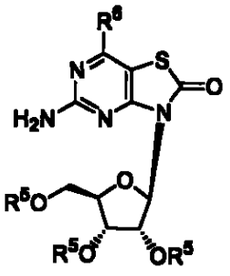
IIe ,



IIf ,



IIg , and



IIh ,

wherein:

each R^1 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted aryl or heteroaryl;

R^2 is H, OH, SH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, which may be interrupted by one or more O, S, or N heteroatoms, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), aryl, or heteroaryl;

R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, -O-(alkyl), -O-(aryl), -O-(heteroaryl), -S-(alkyl), -S-(aryl), -S-(heteroaryl), -NH(alkyl), -NH(aryl), -NH(heteroaryl), -NH(R^4)(alkyl), -NH(R^4)(aryl), or -NH(R^4)(heteroaryl);

R^4 is a substituted or unsubstituted alkyl;

R^5 is independently H, –C(O)(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group –C(O)CHNH_2R^9;

R^6 is H, OR^{10}, or N(R^{11})$_2$;

R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted –C(O)(C_{1-18}alkyl) or –C(O)$_2$(C_{1-18}alkyl);

R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), –OCO_2(C_{1-18}alkyl), –OC(O)(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D-amino acid group –OC(O)CHNH_2R^1;

R^9 is H, or a substituted or unsubstituted alkyl, C(O)CH(C_{1-6} alkyl)NH_2, or –C(O)CH(CH_2-aryl)NH_2;

R^{10} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_6-C_{10} aryl), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_3-C_{10} cycloalkyl), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_4-C_{10} heterocyclic), -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>1}$OH, -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$$CO_2C_{1-18}$ alkyl, and -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$N(R^{14})CO_2C_{1-18} alkyl, and SO_2(aryl), wherein t is an integer from 0 to 6 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, cycloalkyl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, -NH_2, -NH-alkyl, -N(alkyl)$_2$, -NH-aryl, -N(alkyl)(aryl), -N(aryl)$_2$, -NHCHO, -NHC(O)alkyl, -NHC(O)aryl, -N(alkyl)C(O)H, -N(alkyl)C(O)alkyl, -N(aryl)C(O)H, -N(aryl)C(O)alkyl, -NHCO_2alkyl, -N(alkyl)CO_2alkyl, -NHC(O)NH_2, -N(alkyl)C(O)NH_2, -NHC(O)NH-alkyl, -NHC(O) N(alkyl)$_2$, -N(alkyl)C(O)NH-alkyl, N(alkyl)C(O) N(alkyl)$_2$, -NHSO_2-alkyl, -N(alkyl)SO_2-alkyl, -C(O)alkyl, -C(O)aryl, -OC(O)alkyl, -OC(O)aryl, -CO_2-alkyl, -CO_2-aryl, -CO_2H, -C(O)NH_2, -C(O)NH-alkyl, -C(O)N(alkyl)$_2$, -C(O)NH-aryl,

-C(O)N(aryl)$_2$, -C(O)N(alkyl)(aryl), -S(O)alkyl, -S(O)aryl, -SO_2alkyl, -SO_2aryl, -SO_2NH_2, -SO_2NH-alkyl, and -SO_2N(alkyl)$_2$;

R^{11} is independently H, C_{1-6} alkyl, C_3-C_{10} cycloalkyl, or together with nitrogen forms a 5- or 6-membered heterocyclic ring;

R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, or C_{2-6} alkynyl;

R^{14} is H, C_{1-6} alkyl, or -CH_2-aryl;

X is O or S;

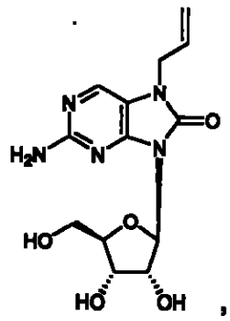
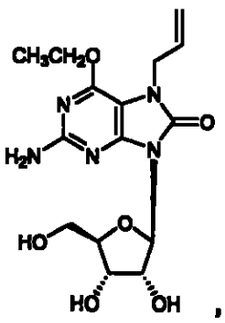
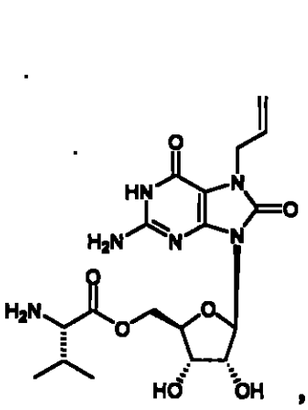
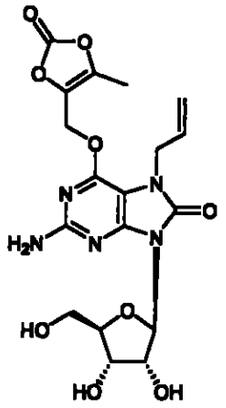
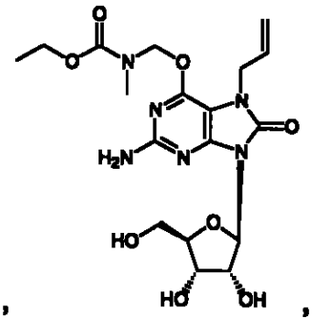
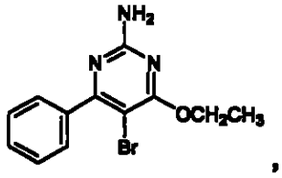
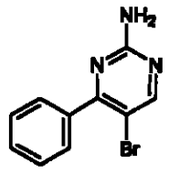
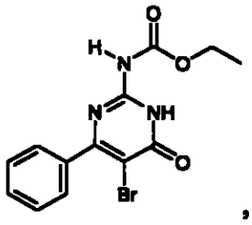
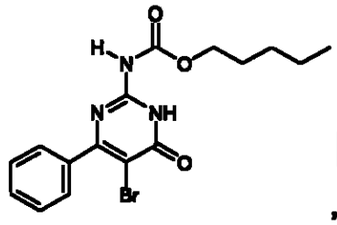
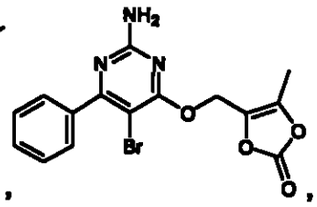
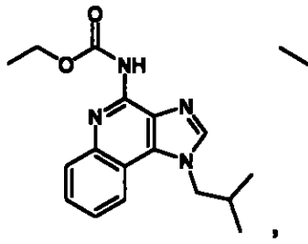
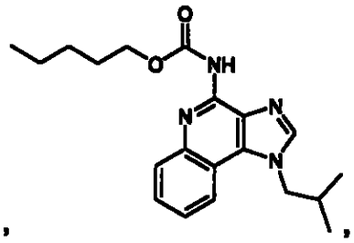
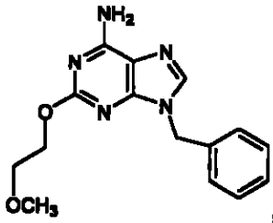
Y is H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, NH_2, NHR^4, $N(R^4)_2$, or a substituted or unsubstituted alkyl or aryl; and

Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4;

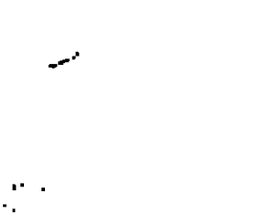
or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate, metabolite or stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate of said stereoisomer.

50. The method of claim 49 wherein R^1 is H or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl; R^2 is H, OH, halo, or a substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl, or alkynyl, or –CH_2-O-(alkyl); R^3 is H, OH, or SH, or a substituted or unsubstituted -O-(alkyl), -S-(alkyl), or -NH(alkyl); R^5 is independently H, –C(O)(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group –C(O)CHNH_2R^9, wherein R^9 is an unsubstituted alkyl; R^6 is H or OR^{10}, wherein R^{10} is independently C_{1-6} alkyl, C_{3-7} alkenyl, C_{3-7} alkynyl, -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_6-C_{10} aryl), -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_4-C_{10} heterocyclic), and -$(CR^{12}R^{13})_{t>0}$N(R^{14})CO_2C_{1-18} alkyl, wherein t is an integer from 0 to 4 unless otherwise indicated, and wherein the alkyl, alkenyl, aryl, and heterocyclic moieties of the foregoing groups are optionally substituted with 1 to 3 substituents independently selected from halo, cyano, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_6 alkenyl, C_2-C_6 alkynyl, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, -CO_2-alkyl, -CO_2-aryl, -OC(O)alkyl, and -OC(O)aryl, and wherein R^{12} and R^{13} are independently H, C_{1-6} alkyl, or C_{2-6} alkenyl; and R^{14} is H, –CH_3, or –CH_2CH_3; R^7 is independently H or a substituted or unsubstituted –C(O)(C_{1-18}alkyl) or –$C(O)_2$(C_{1-18}alkyl); R^8 is H, –OH, -O-(alkyl), –OCO_2(C_{1-18}alkyl), or a racemic, L-, or D- amino acid group –OC(O)CHNH_2R^1; X is O or S; Y is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4; and Z is H, halo, OH, OR^4, SH, or SR^4.

51. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is selected from


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

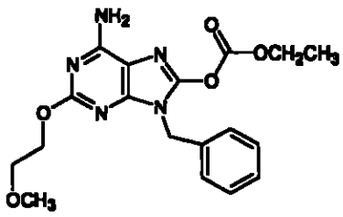
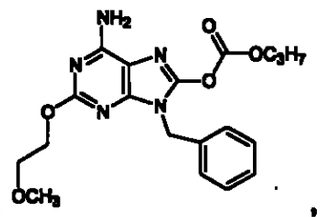
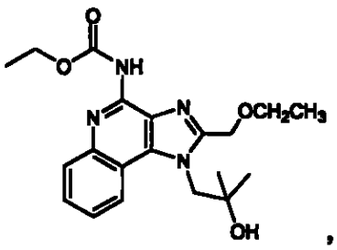
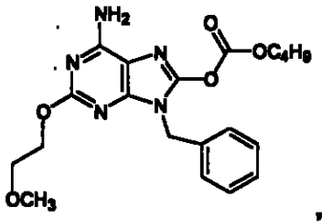
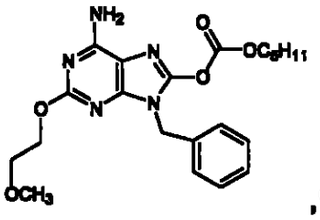
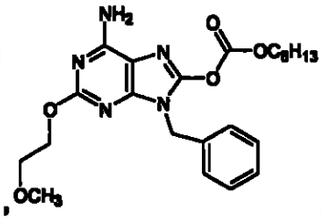
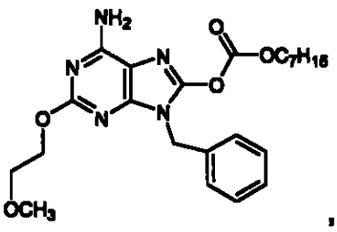
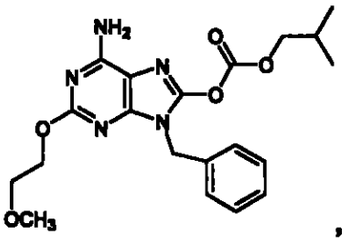
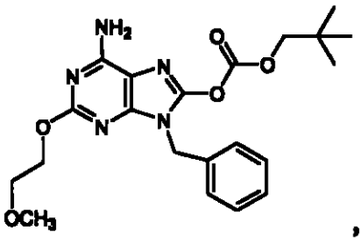
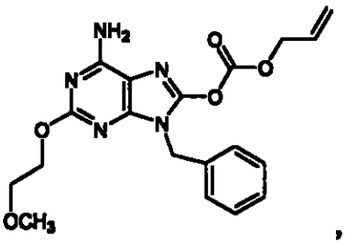
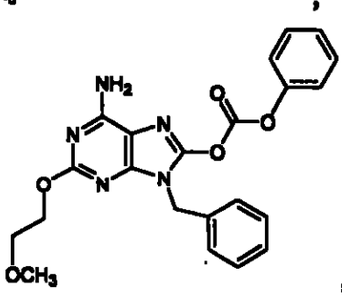
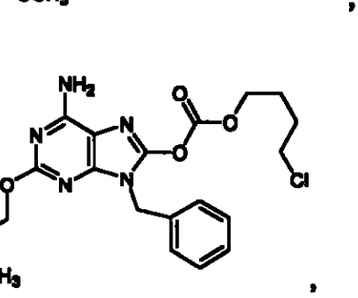
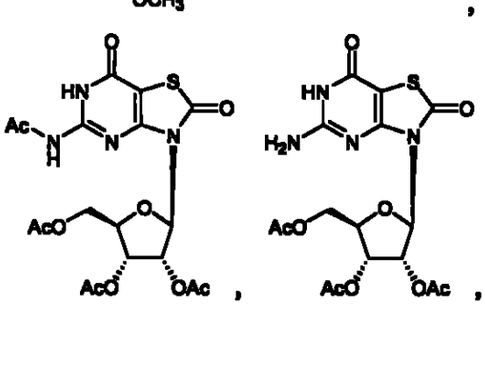
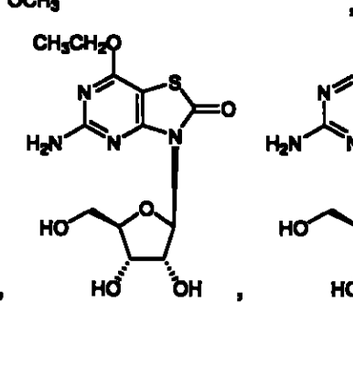
,

,

,

,

,

,

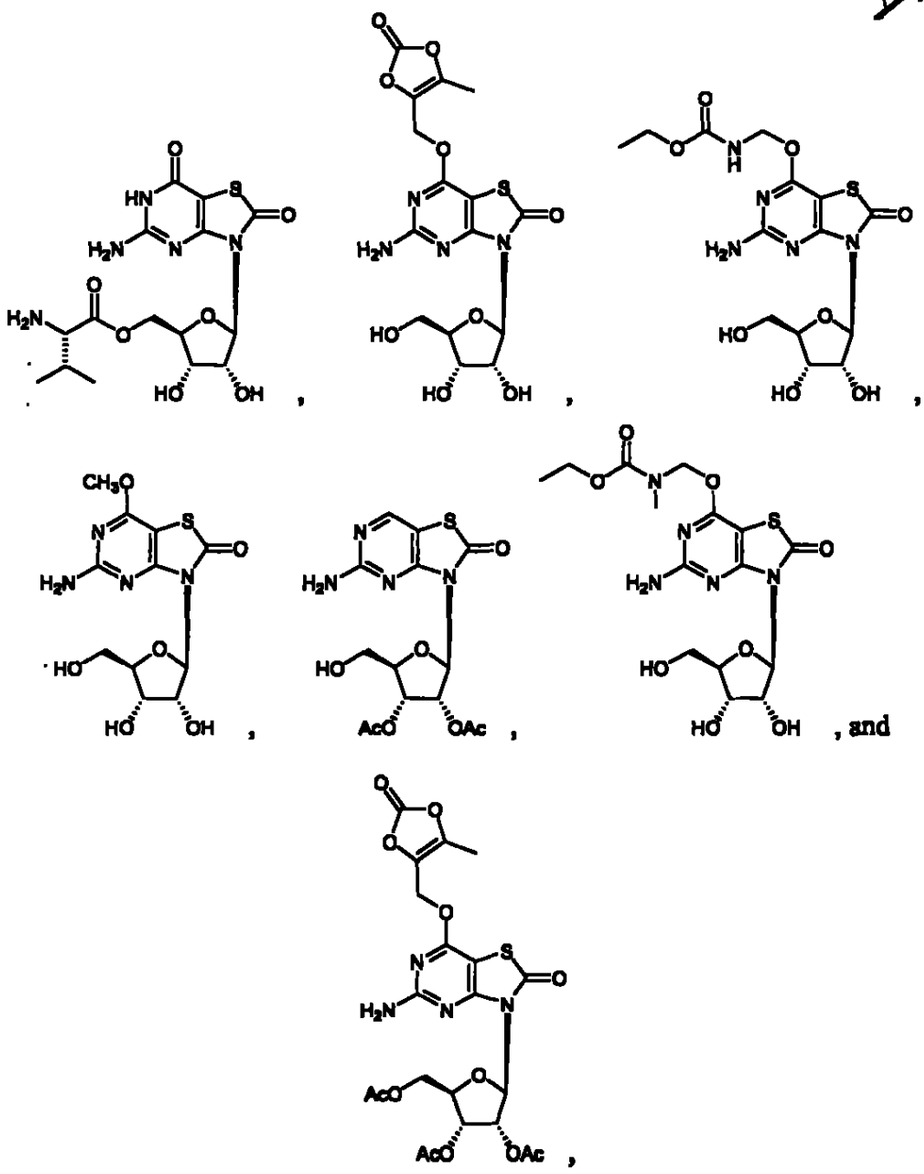

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



52. The method of claim 45 wherein the disease is a viral infection.

53. The method of claim 52 wherein the viral infection is selected from an RNA or DNA virus including adenovirus, cytomegalovirus, hepatitis A virus (HAV), hepadnaviruses including hepatitis B virus (HBV), flaviviruses including Yellow Fever virus, hepaciviruses including hepatitis C virus (HCV), herpes simplex type 1 and 2, herpes zoster, human herpesvirus 6, human immunodeficiency virus (HIV), human papilloma virus (HPV), influenza A virus, influenza B virus, measles, parainfluenza virus, pestivirus, poliovirus, poxvirus (including smallpox and monkeypox virus), rhinovirus, coronovirus, respiratory syncytial virus (RSV), multiple families of viruses that cause hemorrhagic fevers, including the Arenaviruses, the Bunyaviruses and Filoviruses, and a range of viral encephalitides caused by RNA and DNA viruses.

54. The method of claim 45 wherein the disease is a cancer.

55. The method of claim 45 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves an *in vivo* effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 10% to 500% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

56. The method of claim 55 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves an *in vivo* effective plasma concentration of the TLR7 ligand that is 50% to 200% of the effective *in vivo* exposure obtained upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

57. The method of claim 56 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug achieves a therapeutically effective plasma concentration of the corresponding TLR7 ligand without causing gastrointestinal irritation.

58. The method of claim 45 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug reduces undesirable side effects in a patient relative to the side effects upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

59. The method of claim 45 wherein the oral administration of the masked TLR7 ligand prodrug reduces undesirable side effects by 50% in a patient relative to the side effects upon oral administration of the TLR7 ligand alone.

60. The method of claim 45 wherein the side effect is gastrointestinal irritancy.

61. The method of claim 60 wherein the irritancy is hemorrhage.

62. The method of claim 60 wherein the irritancy is lesions.

63. The method of claim 60 wherein the irritancy is emesis.

64. The method of claim 45 wherein the patient is human.

65. The method of claim 45 further comprising administering a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

66. The method of claim 45 further comprising administering an additional therapeutic agent.

67. The method of claim 66 wherein the additional therapeutic agent is an antiviral agent.

68. The method of claim 45 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is 0.001 to 100 mg/kg per day.

69. The method of claim 68 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 0.01 to 50 mg/kg per day.

70. The method of claim 69 wherein the therapeutically or prophylactically effective dose is about 0.1 to 20 mg/kg per day.

71. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered parenterally.

72. The method of claim 71 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered intravenously.

73. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered orally.

74. The method of claim 45 wherein the masked TLR7 ligand prodrug is administered mucosally.

ABSTRACT OF THE INVENTION

[00331] This invention relates to methods for treating or preventing hepatitis C virus infections in mammals using Toll-Like Receptor (TLR)7 ligands and prodrugs thereof. More particularly, this invention relates to methods of orally administering a therapeutically effective amount of one or more prodrugs of TLR7 ligands for the treatment or prevention of hepatitis C viral infection. Oral administration of these TLR7 immunomodulating ligands and prodrugs thereof to a mammal provides therapeutically effective amounts and reduced undesirable side effects.

FIG. 1

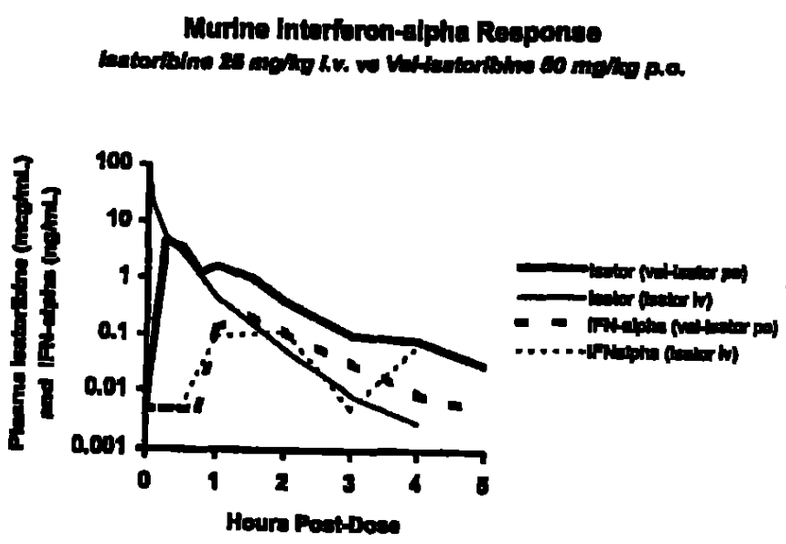
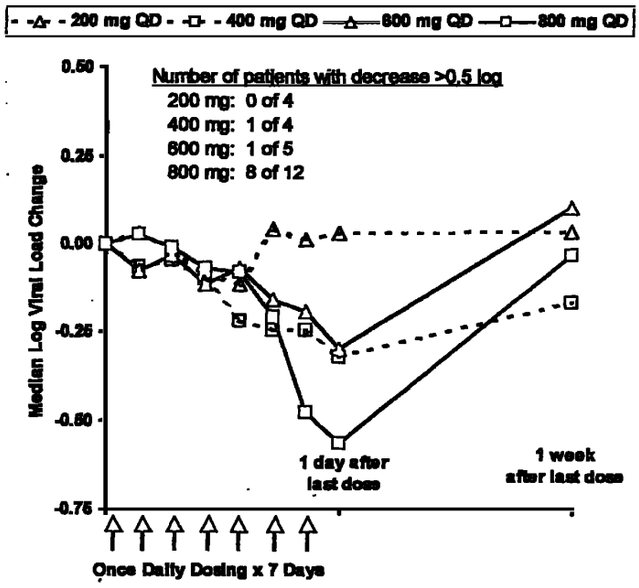

Murine Interferon-alpha Response
Isatoribine 25 mg/kg i.v. vs Val-Isatoribine 50 mg/kg p.o.
Plasma Isatoribine (mcg/mL) and IFN-alpha (ng/mL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
1
2
3
4
5
Hours Post-Dose
Isator (val-isator po)
Isator (isator iv)
IFN-alpha (val-isator po)
IFNalpha (isator iv)

Figure 2


200 mg QD
400 mg QD
600 mg QD
800 mg QD
Number of patients with decrease >0.5 log
200 mg: 0 of 4
400 mg: 1 of 4
600 mg: 1 of 5
800 mg: 8 of 12
Median Log Viral Load Change
0.50
0.25
0.00
-0.25
-0.50
-0.75
1 day after last dose
1 week after last dose
Once Daily Dosing x 7 Days

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

139

(19) rganización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
24 de Marzo de 2005 (24.03.2005)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2005/025583 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 31/708, A61P 31/14

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2004/028236

(22) Fecha de Presentación Internacional:
1 de septiembre de 2004 (01.09.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/500,339 5 de septiembre de 2003 (05.09.2003) US
60/518,996 10 de noviembre de 2003 (10.11.2003) US
60/518,997 10 de noviembre de 2003 (10.11.2003) US

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de US)*: ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 3115 Merryfield Row, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventores, e
(75) Inventores/Solicitantes *(para USA únicamente)*: AVERETT, Devron, R. [US/US]; 2529 Newport Avenue, Cardiff By The Sea, CA 92007 (US).

(74) Agente: PINO, Mark, J.; Connolly Bove Lodge & Hutz LLP, 1990 M Street, N.W., Suite 800, Washington, DC 20036-3425 (US).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
— *con informe internacional de búsqueda*
— *antes del vencimiento del tiempo límite para modificar las reivindicaciones y para volverse a publicar en el caso de recibo de modificaciones*

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:
19 de Mayo de 2005

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

WO 2005/025583 A3

(54) Título: LIGANDOS TLR7 PARA EL TRATAMIENTO DE HEPATITIS C

(57) Extracto: Esta invención se refiere a métodos para tratar o prevenir infecciones por el virus de la hepatitis C en mamíferos usando ligandos de Receptor Tipo Peaje (TLR) 7 y sus profármacos. Más particularmente, esta invención se relaciona con métodos de administrar por vía oral una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más profármacos de ligando TLR7 para el tratamiento o prevención de infección vírica por hepatitis C. La administración oral de estos ligandos inmunomoduladores de TLR7 y su profármacos a un mamífero provee cantidades terapéuticamente efectivas y efectos colaterales indeseables reducidos.

ADMINISTRACIÓN DE LIGANDOS TLR7 Y SUS PROFÁRMACOS PARA TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/500,339, presentada el 5 de septiembre de 2003, Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/518,996, presentada el 10 de noviembre de 2003, y Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/518,997, presentada el 10 de noviembre de 2003.

1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] Esta invención se refiere a métodos para tratar o prevenir infecciones del virus de hepatitis C en mamíferos usando ligandos de Receptor Tipo Peaje (TLR) 7 y sus profármacos. Más particularmente, esta invención se relaciona con métodos de administrar por vía oral una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más profármacos de ligandos TLR7 para el tratamiento o prevención de infección vírica por hepatitis C. La administración oral de estos ligandos inmunomoduladores de TLR7 y sus profármacos a un mamífero provee cantidades terapéuticamente efectivas y menores efectos colaterales indeseables.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] La inmunomodulación por moléculas pequeñas puede lograrse identificando compuestos que fijan y activan Receptores Tipo Peaje (TLRs). Los TLRs juegan un papel importante en las respuestas inmunitarias innatas en mamíferos y, a menudo, son la primera línea de defensa contra patógenos tales como bacterias y virus. Los diferentes TLRs varían en su abundancia en diferentes tipos celulares de mamíferos y varían asimismo con respecto a las estructuras moleculares que fijan el TLR y activan las vías de señalización. Estas vías de señalización llevan al intervalo de respuestas asociadas con la inmunidad innata.

[0004] Los TLRs detectan PAMPs (patrones moleculares asociados

con patógenos) y estimulan las células inmunitarias mediante la vía de señalización TLR-receptor de interleucina 1 (IL-IR) dependiente de MyD88, que lleva a la activación del factor de transcripción NF-κB2. Se han identificado diez miembros funcionales de la familia de TLRs (TLR1 a TLR10). Akira S. *et al., Nature Immunol,* 2, 675-680 (2001). TLR2, TLR4, y TLR5 son cruciales para el reconocimiento de peptidoglicano, lipopolisacárido, y flagelina. Hayashi, F. *et al., Nature,* 410, 1099-1103 (2001). TLR6 se asocia con TLR2 y reconoce lipoproteínas de micoplasma. Ozinsky, A., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA.,* 97, 13766-13771 (2000). TLR9 detecta ADN bacteriano que contiene motivos CpG no metilados y TLR3 activa las células inmunitarias en respuesta a ARN de doble hebra. Hemmi, H. *et al.,* Nature, 408, 740-745 (2000).

[0005] Se ha señalado un número de compuestos, incluidos análogos de guanosina, pirimidinas sustituidas e imidazoquinolinas como ligandos para TLR7. Véase, por ejemplo, Hemmi *et al., Nature* Immunol., 3, 196-200 (2002) (imiquimod y R-848 (resiquimod)); Jurk *et al., Nat. Immunol,* 3, 499 (2002) (R-848); y Lee *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA,* 100, 6646-6651 (2003) (en donde análogos de guanosina loxoribina, 7-tia-8-oxoguanosina (isatoribina), y 7-deazaguanosina y las imidazoquinolinas imiquimod y R-848 (resiquimod) activan selectivamente el TLR7).

[0006] Antes de enlazarse como ligandos potenciales de TLR7, los análogos de guanosina y otros nucleósidos de D- y L-purina han sido objeto de investigación considerable las dos últimas décadas. Véase, por ejemplo, Reitz *et al., J. Med. Chem.,* 37, 3561-78 (1994); Michael *et al., J. Med. Chem.,* 36, 3431-36 (1993) (análogos inmunomoduladores de guanosina con sustituyentes en las posiciones 7- y/o 8-); Patente de los Estados Unidos No. 5,821,236 a Krenitsky *et al.* (que divulga derivados 6-alcoxi de derivados de arabinofuranosil purina que son útiles para terapia anti-neoplásica ***tumor therapy***); Patente de los Estados Unidos No. 5,041,426 a Robins *et al* (se divulgan ciertos nucleósidos de pirimido[4,5-d]piridimina como efectivos en el tratamiento contra L1210 en ratones BDF1); Revankar *et al., J. Med. Chem.,* 27, 1489-96 (1984) (nucleósidos de 3-deazaguanina y

nucleótidos que demuestran una significativa actividad antivírica de amplio espectro contra ciertos virus ADN y ARN);

[0007] Recientemente se ha identificado en la literatura como ligandos TLR7 un número de compuestos, conocidos por ser inmunoestimulantes, *véase por ejemplo,* Heil *et al., Eur. J. Immunol,* 33(11), 2987-97 (2003), Lore *et al., J. Immunol,* 171(8), 4320-8 (2003), Nagase *et al., J. Immunol,* 171(8), 3977-82 (2003), Mohty *et al., J. Immunol,* 171(7), 3385-93 (2003), Pinhal-Enfield, *et al., Am. J. Pathol,* 163(2), 711-21 (2003), Doxsee *et al., J. Immunol,* 171(3), 1156-63 (2003), Bottcher *et al., Neurosci. Lett.,* 344(1), 17-20 (2003), Kaisho *et al., Curr. Mol Med.,* 3(4), 373-85 (2003), Okada *et al., Eur. J. Immunol,* 33(4), 1012-9 (2003), Edwards *et al., Eur. J. Immunol,* 33(4), 827-33 (2003), Akira *et al., Immunol Lett.,* 85(2), 85-95 (2003), Ito *et al., Hum. Immunol,* 63(12), 1120-5 (2002), Rothenfusser *et al., Hum. Immunol,* 63(12), 1111-9 (2002), Yamamoto *et al., J. Immunol,* 169(12), 6668-72 (2002), Gibson *et al., Cell Immunol,* 218(1-2), 74-86 (2002), Horng *et al., Nature,* 420 (6913), 329-33 (2002), Yamamoto *et al., Nature,* 420(6913), 324-9 (2002), Applequist *et al., Int. Immunol,* 14(9), 1065-74 (2002), Sato *et al., Int. Immunol,* 14(7), 783-91 (2002); Jurk *et al., Nat. Immunol,* 3(6), 499 (2002); Hornung *et al., J. Immunol,* 168(9), 4531-7 (2002), Hemmi *et al., Nat. Immunol,* 3(2), 196-200 (2002); Bruno *et al., Eur. J. Immunol,* 31(11), 3403-12 (2001); Jarrossay *et al., Eur. J. Immunol,* 31(11), 3388-93 (2001); Miettinen *et al., Genes Immun.,* 2(6), 349-55 (2001), Chuang *et al., Eur. Cytokine Netw.,* 11(3), 372-8 (2000), y Du *et al., Eur. Cytokine Netw.,* 11(3), 362-71 (2000).

[0008] Estos ligandos TLR7 son conocidos por estimular respuestas inmunitarias *in vitro* y en especies animales, y esto ha llevado al análisis de los usos de estos compuestos para varias aplicaciones terapéuticas, incluidas terapias anti-víricas y del cáncer. Estos compuestos se han caracterizado como análogos o derivados de a) guanosina, b) imidazoquinolina, y c) pirimidina. Véase Akira, *Current Opinion,* 15, 5-11 (2003). Se ha descubierto un miembro (imiquimod) de la clase química imidazoquinolina efectivo para tratar infecciones genitales tópicas por papilomavirus. Un

segundo miembro de la clase imidazoquinolina, resiquimod, se ha analizado para el tratamiento de HCV, pero este compuesto no mostró efecto anti-HCV con dosis orales toleradas. Pockros *et al., Gastroenterology,* 124 (Suppl 1), A-766 (2003).

[0009] Por consiguiente, aunque ha habido algún uso limitado de los ligandos TLR7 para el tratamiento de enfermedad inmunitaria e infecciones víricas; véase por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos No. 5,041,426 y 4,880,784 a Robins *et al.* (3-ß-D-ribofuranosiltiazolo[4,5-d]piridiminas que demuestran inmunoactividad significativa, incluida proliferación de esplenocitos murinos y actividad *in vivo* contra el virus Semliki Forest); Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0199461 y WO 03/045968 a Averett *et al.* (nucleósidos de 3-ß-D-ribofuranosiltiazolo[4,5-d]pirimidina que demuestran actividad contra infecciones crónicas y agudas de virus ADN y ARN); hasta la fecha los ligandos han demostrado su ineficacia para el tratamiento o prevención de virus de hepatitis C.

[0010] Se sabe asimismo que la administración oral de muchos análogos de nucleósido de purina están sujetos a problemas derivados de baja absorción, baja solubilidad, o degradación en el tracto digestivo como resultado de condiciones alcalinas o ácidas o la acción de enzimas, y/o combinaciones de estos fenómenos. Por lo tanto, subsiste una necesidad de análogos de nucleósido de purina con biodisponibilidad oral mejorada y administración, que se emplean para modular aspectos del sistema inmunitario.

[0011] Más aún, los nucleósidos inmunomoduladores tienen una tolerabilidad oral relativamente baja cuando se compara con la de la vía intravenosa. Además, el tracto gastrointestinal presenta una barrrera de tolerabilidad particular a agentes inmunitarios en virtud de la gran cantidad de tejido inmunitario asociado con la pared intestinal (es decir, intestino). Aunque éste es un mecanismo biológico importante para prevenir la invasión del cuerpo por la flora intestinal, el tejido inmunitario puede afectarse preferencialmente luego de la administración oral de compuestos

inmunomoduladores debido a las concentraciones locales elevadas del compuesto administrado en el intestino. Esto lleva a efectos colaterales indeseables; por ejemplo en el caso de agentes activadores inmunitarios se observa gastroenteritis y efectos hemorrágicos localizados.

[0012] Una solución al problema de la administración oral efectiva de inmunomoduladores no es evidente en la literatura. La evidencia disponible indica que niveles sistémicos de fármacos administrados en esta clase se han limitado por toxicidades gastrointestinales luego de dosis orales bajas. Por lo tanto, subsiste una necesidad de ligandos TLR7 inmunomoduladores que tienen disponibilidad oral mejorada e irritabilidad gastrointestinal reducida (***"reduced gastrointestinal irritancy"***).

3. SUMARIO DE LA INVENCIÓN

3.1 Ligandos TLR7

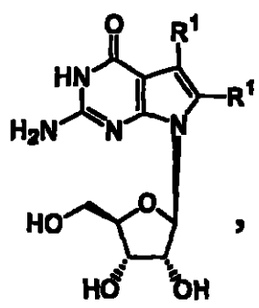
[0013] Esta invención comprende métodos novedosos para el tratamiento o prevención de infección vírica de hepatitis C, y composiciones farmacéuticas novedosas que utilizan ligandos TLR7 o sus sales, hidratos, metabolitos o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables.

[0014] En una incorporación, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

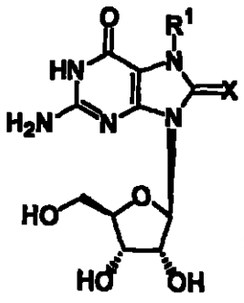
[0015] En otra incorporación, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 seleccionado de análogos y derivados de a) guanosina b) imidazoquinolina c) adenina, y) pirimidina.

[0016] En otra incorporación, la invención comprende un método de

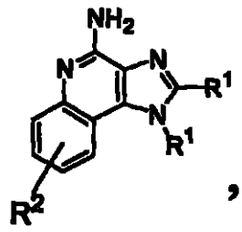
tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 seleccionado de



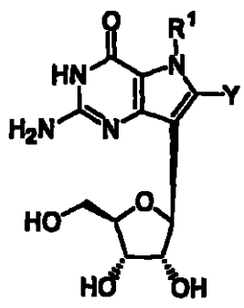
Ia



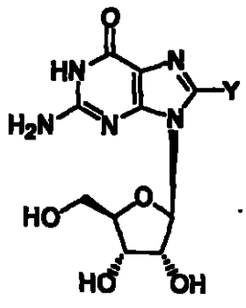
Ib



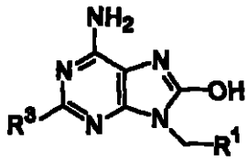
Ic



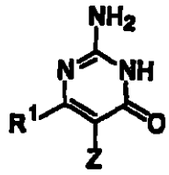
Id



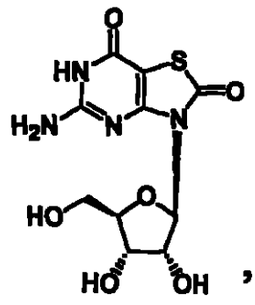
Ie



If



Ig



Ih

en donde:

cada R^1 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo;

R^2 es H, OH, SH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o

alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), arilo, o heteroarilo;

R^3 es H, OH, o SH, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -O-(alquilo), -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), -NH(alquilo), -NH(arilo), -NH(heteroarilo), -NH(R^4)(alquilo), -NH(R^4)(arilo), o -NH(R^4)(heteroarilo), en donde R^4 es un alquilo sustituido o no sustituido;

X es O ó S;

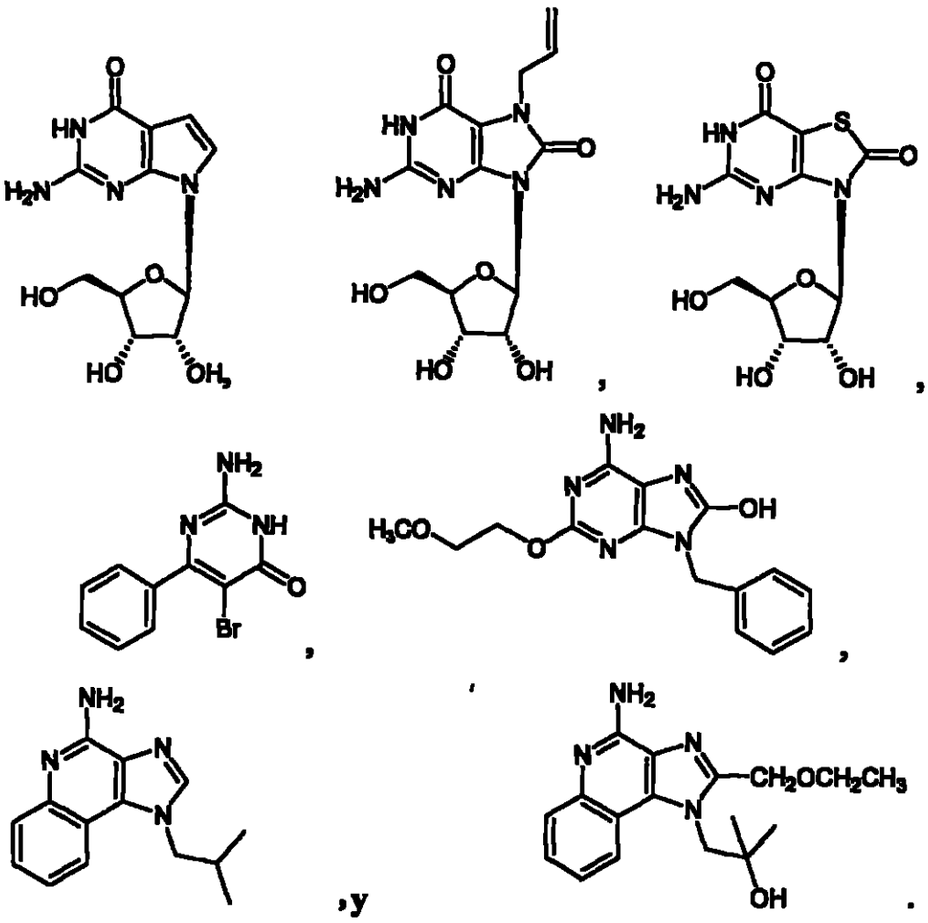
Y es H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, o un alquilo sustituido o no sustituido o arilo;

Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4;

o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

[0017] En otra incorporación, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 seleccionado de Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, y Ih, en donde R^1 es H o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo; R^2 es H, OH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, o -CH_2-O-(alquilo); R^3 es H, OH, o SH, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -S-(alquilo), o -NH(alquilo); X es O ó S; Y es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4; y Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4.

[0018] En otra incorporación, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 seleccionado de



o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable.

[0019] En un aspecto, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un mamífero necesitado de ello, preferiblemente en un humano necesitado de ello.

[0020] En una incorporación alternativa, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 y un excipiente, portador, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0021] En una incorporación alternativa, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 por vía oral, mucosa, tópica o transdérmica.

[0022] En una incorporación preferida, la invención comprende un

método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 por vía parenteral.

[0023] En una incorporación separada, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 y un agente terapéutico adicional, preferiblemente un agente antiviral o inmunomodulador adicional.

[0024] La invención abarca además composiciones farmacéuticas, apropiadas para administración parenteral a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un ligando TLR7 de la invención en una forma estéril; composiciones farmacéuticas apropiadas para administración oral a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un ligando TLR7 de la invención, en donde tales composiciones se formulan para reducir la exposición de la anatomía inmunitaria sub-epitelial al ligando TLR7 mejorando al mismo tiempo la absorción sistémica del ligando TLR7 ; composiciones farmacéuticas apropiadas para administración mucosal a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un ligando TLR7 de la invención, en donde tales composiciones se formulan para reducir la exposición de la anatomía inmunitaria sub-epitelial al ligando TLR7 mejorando al mismo tiempo la absorción sistémica del ligando TLR7; y composiciones farmacéuticas apropiadas para administración tópica a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un ligando TLR7 de la invención, en donde tales composiciones se formulan para reducir la exposición de la anatomía inmunitaria sub-epitelial al ligando TLR7 mejorando al mismo tiempo la absorción sistémica del ligando TLR7. Dependiendo del tejido específico por tratarse, pueden usarse componentes adicionales, tales como reforzadores de penetración, antes de, en conjunción

con, o subsiguiente al tratamiento con ingredientes activos de la invención. En una incorporación preferida, cada una de estas composiciones está en una presentación farmacéutica unitaria simple y comprende una cantidad de ingrediente activo, suficiente para tratar o prevenir la infección humana por el virus de la hepatitis C.

[0025] En una incorporación específica, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un ligando TLR7 seleccionado de análogos y derivados de a) guanosina, b) imidazoquinolina, c) adenina, y d) pirimidina.

[0026] En otra incorporación específica, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un ligando TLR7 seleccionado de Fórmulas Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, y Ih, o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

3.2 Profármacos de Ligando TLR7

[0027] Esta invención contiene igualmente métodos novedosos para el tratamiento o prevención de infección vírica de hepatitis C, y novedosas composiciones farmacéuticas que utilizan profármacos de ligando TLR7 o sus sales, hidratos, metabolitos o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables.

[0028] En igual forma esta invención incluye métodos novedosos de tratar enfermedades sensibles a inmunoterapia con agentes inmunitarios, [métodos] que comprenden administrar por vía oral un profármaco de ligando TLR7 a un paciente necesitado de inmunoterapia, en donde el profármaco de TLR7 logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del ligando TLR7 en el paciente.

[0029] En una incorporación, la invención contiene un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, [método] que comprende administrar por vía oral al paciente un profármaco de ligando TLR7 o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del ligando TLR7

reduciendo al mismo tiempo los efectos colaterales indeseables asociados con ligandos TLR7. En una incorporación preferida, el profármaco de ligando TLR7 es un profármaco de ligando TLR7 enmascarado.

[0030] En otra incorporación, la invención contiene además un método de tratar enfermedades sensibles a inmunoterapia, reduciendo al mismo tiempo los efectos colaterales indeseables asociados con agentes inmunitarios, [método] que comprende administrar por vía oral un profármaco de ligando TLR7 a un paciente necesitado de inmunoterapia, en donde el profármaco de TLR7 logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del ligando TLR7 en el paciente. En una incorporación preferida, el profármaco de ligando TLR7 es un profármaco de ligando TLR7 enmascarado.

[0031] En otra incorporación, la administración oral del profármaco de ligando TLR7 mejora la biodisponibilidad *in vivo* del ligando TLR7. En una incorporación preferida, la administración oral del profármaco de ligando TLR7 logra un concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 10% a 500% de la exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de la administración oral del ligando TLR7 solo. En otra incorporación preferida, la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 50% a 200% de la exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de la administración oral del ligando TLR7 solo.

[0032] En otra incorporación, la administración oral del profármaco de ligando TLR7 reduce efectos colaterales adversos. En una incorporación preferida, el efecto colateral comprende irritabilidad gastrointestinal, en donde la irritabilidad gastrointestinal comprende hemorragia, lesiones, y émesis.

[0033] En otra incorporación, el profármaco de ligando TLR7 mejora la disponibilidad oral en por lo menos 25% y reduce la irritabilidad gastrointestinal en por lo menos 50% en un paciente, en relación con la administración oral del ligando TLR7 solo. En otra incorporación, el profármaco de ligando TLR7 mejora la disponibilidad oral en por lo menos

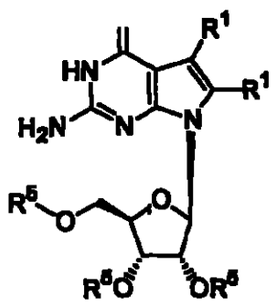
50% y reduce la irritabilidad gastrointestinal, de modo que se limitan otras toxicidades en un paciente, en relación con la administración oral del ligando TLR7 solo.

[0034] En una incorporación preferida, el profármaco de ligando TLR7 logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva que es 25% a 200% de la concentración efectiva *in vivo* del ligando TLR7 en un paciente luego de la administración oral, con irritabilidad gastrointestinal mínima.

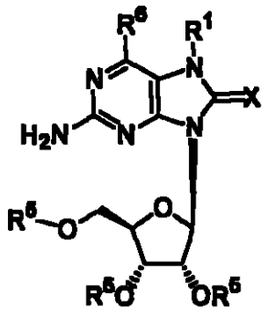
[0035] En una incorporación, los métodos de la invención comprenden administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 seleccionado de análogos y derivados de a) guanosina, b) imidazoquinolina, c) adenina, y d) pirimidina.

[0036] En otra incorporación, los métodos de la invención incluyen administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 seleccionado de análogos y derivados de a) guanosina, b) imidazoquinolina, c) adenina, y d) pirimidina, en donde el profármaco es (a) una fracción amida, carbamato, o amidina luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, carbonato, carbamato, éter, imidato, acetal, aminal, o cetal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de ligando TLR7, (c) una fracción acetal o cetal luego de la conversión de un sustituyente ceto de ligando TLR7, (d) una fracción imidato luego de la conversión de un carbonilo de ligando TLR7 de un sustituyente amido, (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un sustituyente oxo de ligando TLR7 de pirimidina o guanosina, o (f) amina.

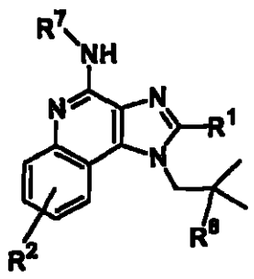
[0037] En otra incorporación, los métodos de la invención incluyen administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 seleccionado de



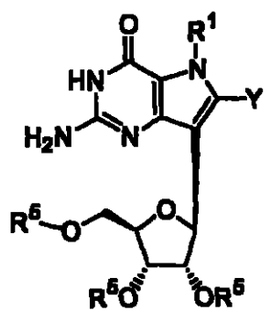
IIa ,



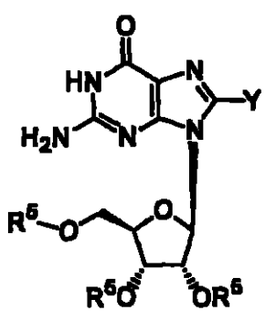
IIb ,



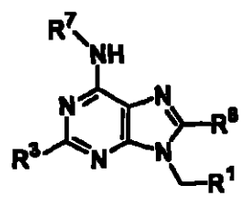
IIc ,



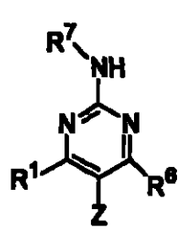
IId ,



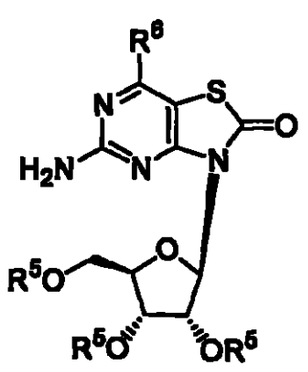
IIe ,



IIf ,



IIg ; y



IIh ,

en donde:

cada R^1 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo;

R^2 es H, OH, SH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -O-(arilo), -O-

(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), arilo, o heteroarilo;

R^3 es H, OH, o SH, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -O-(alquilo), -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), -NH(alquilo), -NH(arilo), -NH(heteroarilo), -NH(R^4)(alquilo), -NH(R^4)(arilo), o -NH(R^4)(heteroarilo);

R^4 es un alquilo sustituido o no sustituido;

R^5 es independientemente H, -C(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -C(O)CHNH_2R^9;

R^6 es H, OR^{10}, o N(R^{11})$_2$;

R^7 es independientemente H o un -C(O)(C_{1-18}alquilo) o -C(O)$_2$(C_{1-18}alquilo) sustituido o no sustituido;

R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), -OCO_2(C_{1-18}alquilo), -OC(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo amino ácido L-, o D-, racémico -OC(O)CHNH_2R^1;

R^9 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, C(O)CH(C_{1-6}alquil)NH_2, o -C(O)CH(CH_2-aril)NH_2;

R^{10} es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_{3-7}alquenilo, C_{3-7}alquinilo, -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_6-C_{10} arilo),

-($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_3-C_{10}cicloalquilo), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_4-C_{10}heterocíclico), -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>1}$OH,

-($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$$CO_2C_{1-18}$alquilo, y -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$N($R^{14}$)$CO_2C_{1-18}$alquilo, y SO_2(arilo),

en donde t es un entero que va de 0 a 6 a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, -NH_2, -NH-alquilo, -N(alquil)$_2$, -NH-arilo, -N(alquil)(arilo), -N(aril)$_2$, -NHCHO, -NHC(O)alquilo, -NHC(O)arilo, -N(alquil)C(O)H, -N(alquil)C(O)alquilo, -N(aril)C(O)H, -N(aril)C(O)alquilo, -NHCO_2alquilo, -N(alquil)CO_2alquilo, -NHC(O)NH_2, -N(alquil)C(O)NH_2, -NHC(O)NH-alquilo, -NHC(O) N(alquil)$_2$, -N(alquil)C(O)NH-alquilo, N(alquil)C(O) N(alquil)$_2$, -NHSO_2-alquilo, -

N(alquil)SO_2-alquilo, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)arilo, -CO_2-alquilo, -CO_2-arilo, -CO_2H, -$C(O)NH_2$, -C(O)NH-alquilo, -$C(O)N(alquil)_2$, -C(O)NH-arilo, -$C(O)N(aril)_2$, -C(O)N(alquil)(arilo), -S(O)alquilo, -S(O)arilo, -SO_2alquilo, -SO_2arilo, -SO_2NH_2, -SO_2NH-alquilo, y -$SO_2N(alquil)_2$;

R^{11} es independientemente H, C_{1-6} alquilo, C_3-C_{10} cicloalquilo, o conjuntamente con nitrógeno forma un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros;

R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, C_{2-6} alquenilo, o C_{2-6} alquinilo;

R^{14} es H, C_{1-6} alquilo, o -CH_2-arilo;

X es O ó S;

Y es H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, o un alquilo sustituido o no sustituido o arilo; y

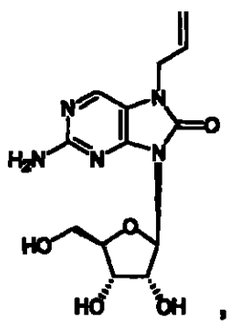
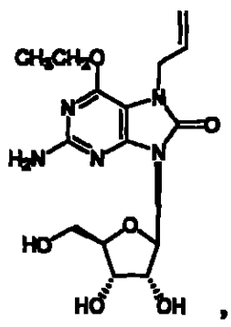
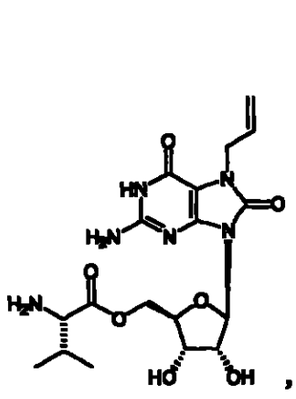
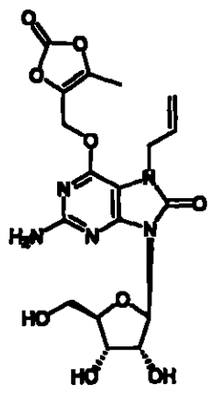
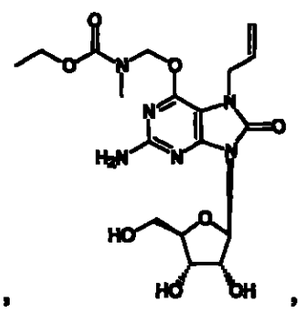
Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4;

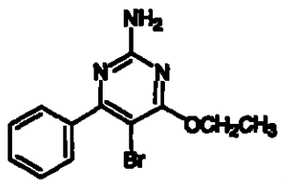
o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

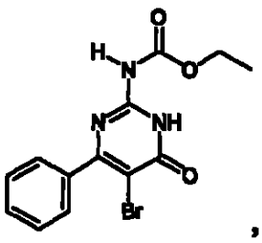
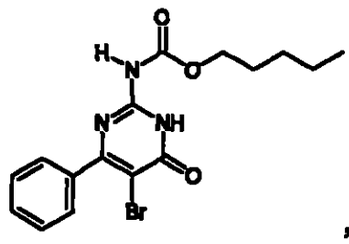
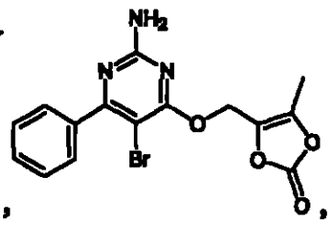
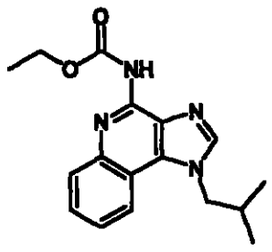
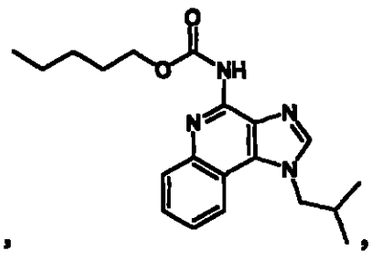
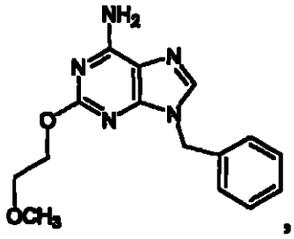
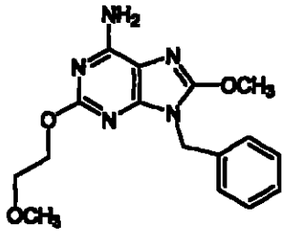
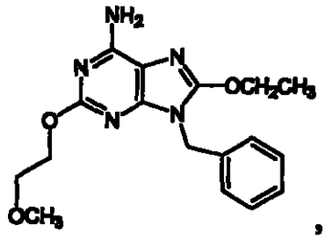
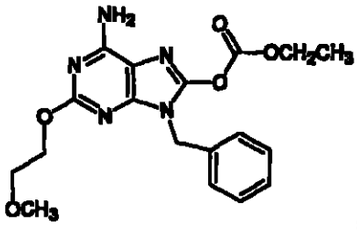
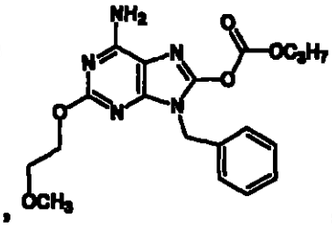
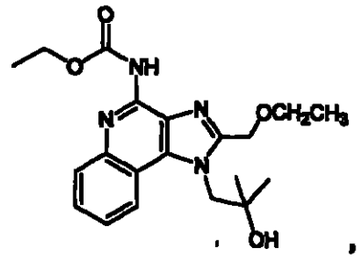
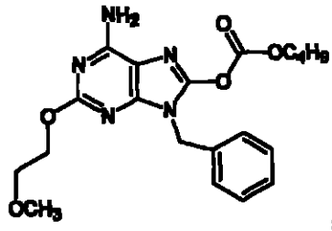
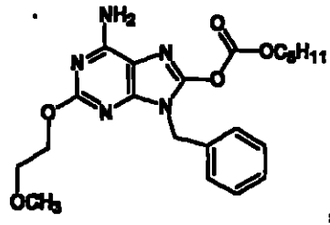
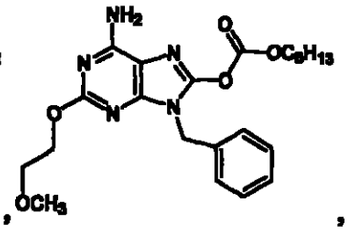
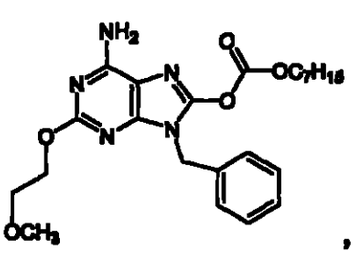
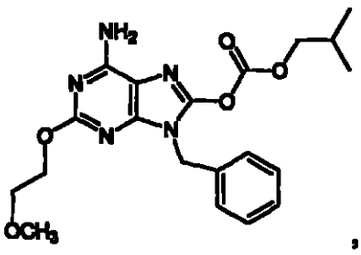
[0038] En otra incorporación, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, [método] que incluye administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 seleccionado de Fórmula IIa, IIb, IIe, IId, IIe, IIf, IIg, y IIh, en donde R^1 es H o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo; R^2 es H, OH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, o -CH_2-O-(alquilo); R^3 es H, OH, ó SH, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -S-(alquilo), o -NH(alquilo); R^5 es independientemente H, -C(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -$C(O)CHNH_2R^9$, en donde R^9 es un alquilo no sustituido; R^6 es H ó OR^{10}, en donde R^{10} es independientemente C_{1-6} alquilo, C_{3-7} alquenilo, C_{3-7} alquinilo, -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_6-C_{10}arilo), -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_4-C_{10}heterocíclico), y -$(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alquilo, en donde t es un entero que va de 0 a 4 a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo,

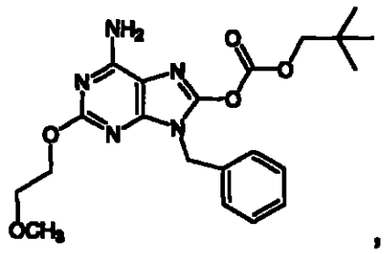
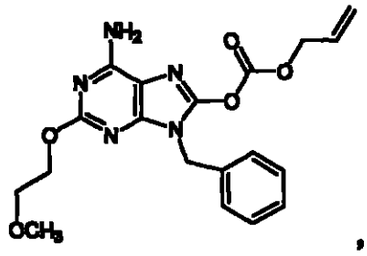
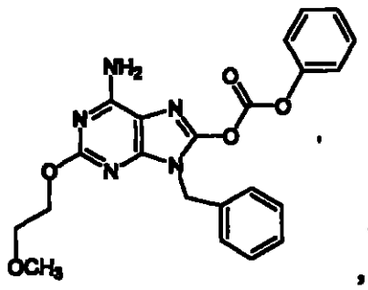
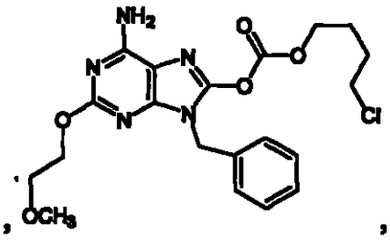
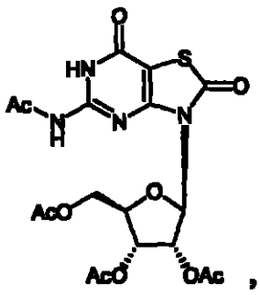
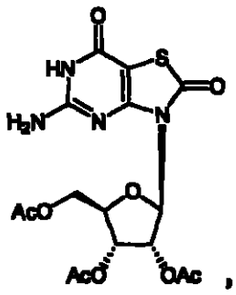
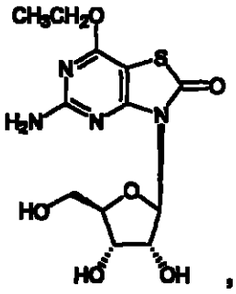
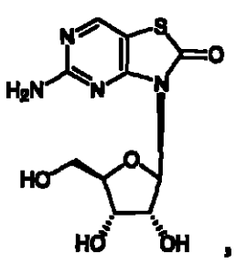
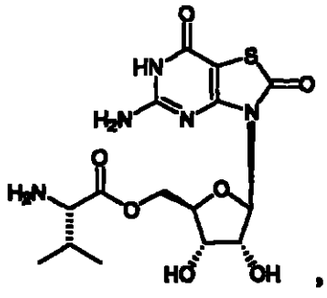
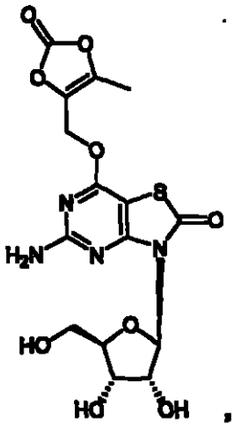
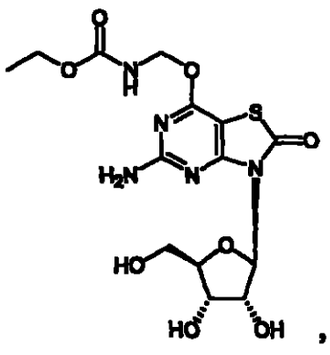
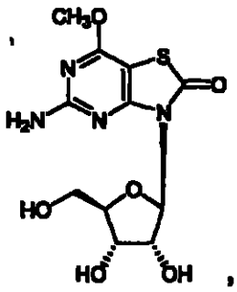
alquenilo, arilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, -CO_2-alquilo, -CO_2-arilo, -OC(O)alquilo, y -OC(O)arilo, y en donde R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, o C_{2-6} alquenilo; y R^{14} es H, -CH_3, ó -CH_2CH_3; R^7 es independientemente H o un -C(O)(C1-18alquilo) sustituido o no sustituido o -$C(O)_2$(C_{1-18}alquilo); R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), -OCO_2(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -OC(O)CHNH_2R^1; X es O ó S; Y es H, halo, OH, OR^4,
SH, ó SR^4; y Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4.

[0039] En una incorporación específica, la invención comprende un método de tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 seleccionado de


,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

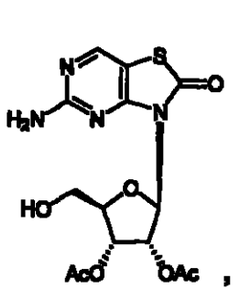
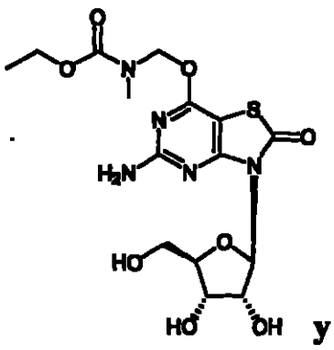
,

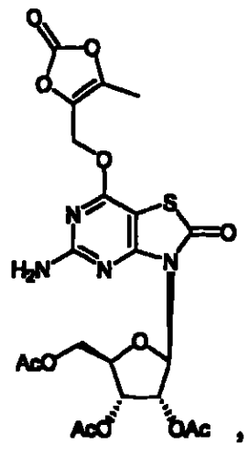
,

,

,

,

,

,

y



o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

[0040] En otra incorporación preferida de la invención, el profármaco de ligando TLR7 es un profármaco de éster de aminoácido del ligando TLR7. En otra incorporación preferida, el profármaco de éster de aminoácido del ligando TLR7 es un éster de valilo.

[0041] En una incorporación de la invención, R^5 no es un grupo aminoácido L-, o D-, racémico $-C(O)CHNH_2R^9$. En otra incorporación, R^5 no es un grupo aminoácido, L-, o D-, racémico $-C(O)CHNH_2R^9$ cuando el profármaco de ligando TLR7 se selecciona de un compuesto de Fórmula IIh.

[0042] En otra incorporación alternativa, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 y un excipiente, portador, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0043] En una incorporación separada, la invención comprende un método para tratar o prevenir la infección del virus de la hepatitis C en un paciente necesitado de ello, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un profármaco de un ligando TLR7 y un agente terapéutico adicional, preferiblemente un agente anti-vírico o inmunomodulador adicional.

[0044] La invención incluye asimismo composiciones farmacéuticas apropiadas para administración parenteral a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un profármaco de un ligando TLR7 de la invención en una forma estéril; composiciones farmacéuticas apropiadas para administración parenteral a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un profármaco de un ligando TLR7 de la invención; composiciones farmacéuticas apropiadas para administración mucosal a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un profármaco de un ligando TLR7 de la invención; y composiciones farmacéuticas apropiadas para administración tópica a un paciente, que comprenden una cantidad terapéutica o farmacéuticamente aceptable de un profármaco de un ligando TLR7 de la invención. Dependiendo del tejido específico por tratarse, pueden usarse componentes adicionales, tales como reforzadores de penetración, antes de, en conjunción con, o subsiguiente al tratamiento con ingredientes activos de la invención. En una incorporación preferida, cada una de estas composiciones está en una presentación farmacéutica unitaria simple y comprende una cantidad de ingrediente activo suficiente para tratar o prevenir la infección humana por el virus de la hepatitis C.

[0045] En a incorporación específica, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un profármaco de un ligando TLR7 seleccionado de Fórmula IIa, IIb, IIe, IId, IIe, IIf, IIg, y IIh, o su sal, hidrato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

[0046] En otra incorporación de la invención, y dependiendo del tejido específico por tratarse, pueden usarse componentes adicionales, incluidos, pero no limitados a, reforzadores de penetración, moléculas que toman como diana el área de la infección y moléculas que reducen la toxicidad *in vivo* del profármaco de un ligando TLR7, antes de, en conjunción con, o subsiguiente al tratamiento con uno o más profármacos de ligando TLR7 de la invención.

[0047] El profármaco de ligando TLR7s son útiles como reforzadores del sistema inmunitario y poseen ciertas propiedades del sistema inmunitario, incluidas modulación, mitogenicidad, aumento, y/o potenciación, o son intermedios para compuestos que tienen estas propiedades. Se espera que los compuestos manifiesten los efectos luego de la administración a un mamífero en por lo menos una de las poblaciones de células caracterizadas como los linfocitos citolíticos naturales (***"the natural killer cells"***), macrófagos, células dendríticas, y linfocitos del sistema inmunitario del anfitrión. Debido a estas propiedades, ellos son útiles como agentes anti-infecciosos, incluidos, pero no limitados a, agentes anti-víricos, y como agentes anti-neoplásicos o como intermedios para los mismos. Pueden usarse para tratar un anfitrión afectado sirviendo como los ingredientes activos de composiciones farmacéuticas apropiadas.

[0048] En un aspecto de la invención, los profármacos de ligando TLR7 se utilizan para tratar toda la gama de enfermedades víricas en mamíferos administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos. Enfermedades víricas contempladas para tratarse con profármacos de ligando TLR7 incluyen infecciones crónicas y agudas causadas por virus ADN y ARN. Sin limitar de ningún modo la gama de infecciones víricas que pueden tratarse, los profármacos de ligando TLR7 son particularmente útiles en el tratamiento de infecciones causadas por adenovirus, citomegalovirus, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), flavivirus incluido el virus de la fiebre amarilla, hepacivirus incluido el virus de la hepatitis C (HCV), herpes simplex tipo 1 y *2*, herpes zoster, herpesvirus 6 humano, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de papiloma humano (HPV), virus de la influenza A, virus de la influenza B, sarampión, virus de la parainfluenza, pestivirus, poliovirus, poxvirus (incluido el virus de la viruela y de la viruela de los monos), rinovirus, coronovirus, virus respiratorio sincitial (RSV), múltiples familias de virus que causan fiebres hemorrágicas, incluido los Arenavirus (LCM, virus Junin, virus Machupo, virus Guanarito, y fiebre de lassa), los virus Bunya (virus Hanta y fiebre del Valle de Rift) y Filovirus (virus de

Ébola y Marburg), una gama de encefalitis víricas incluidas el virus del Nilo occidental, virus LaCrosse, virus de la encefalitis de California, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus del bosque Kysanur, y virus portados por garrapatas tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

[0049] En otro aspecto de la invención, los profármacos de ligando TLR7 se utilizan para tratar infecciones bacterianas, fúngicas y protozoarias en mamíferos, administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de los profármacos. Se contempla que toda la gama de microorganismos patógenos susceptibles de tratarse por los profármacos de ligando TLR7 de la presente invención, incluidos sin limitación aquellos organismos que son resistentes a los antibióticos. La capacidad de los profármacos de ligando TLR7 de activar múltiples componentes del sistema inmunitario elude mecanismos de resistencia encontrados comúnmente para reducir la susceptibilidad a antibióticos y, por consiguiente, el tratamiento de infecciones en un mamífero, causadas por dichos microorganismos resistentes por profármacos de ligando TLR7, es una utilidad particular de la presente invención.

[0050] En otro aspecto de la invención, los profármacos de ligando TLR7 se utilizan para tratar tumores en mamíferos, administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de los profármacos. Los tumores o neoplasias contemplados para tratarse incluyen aquellos resultantes de aberraciones en procesos celulares normales así como los causados por virus, y el efecto puede involucrar inhibir la difusión de células cancerosas, acelerar la eliminación de células cancerosas, inhibir la transformación de células infectadas con virus a un estado neoplásico, inhibir la difusión de virus de células transformadas a otras células normales, y/o detener el crecimiento de células transformadas con virus. Se espera que los profármacos de ligandos TLR7 sean útiles contra un amplio espectro de tumores, incluidos, pero no limitados a carcinomas, sarcomas, y leucemias. Incluidos en tal clase se encuentran carcinomas de mama, colon,

vejiga, pulmón, próstata, estómago, y páncreas y leucemias linfoblásticas y mieloides.

[0051] En otro aspecto de la invención, un método de tratar un mamífero comprende administrar una cantidad terapéutica y/o profilácticamente efectiva de un producto farmacéutico que contiene un profármaco de ligando TLR7 de la invención. En este aspecto, el efecto puede referirse a la modulación de alguna porción del sistema inmunitario del mamífero, especialmente la modulación de actividades de citocinas de Th1 y Th2, incluidas pero no limitadas a la familia de interleucinas, por ejemplo, IL-1 a IL-12, y otras citocinas tales como TNFα, e interferones incluidos interferón α, interferón β, e interferón γ, y sus efectores corriente abajo (***"downsteam effectors"***). Donde ocurre la modulación de citocinas Th1 y Th2, se contempla que la modulación puede incluir la estimulación de las dos Th1 y Th2, la supresión de las dos Th1 y Th2, la estimulación de cualquiera de Th1 ó Th2 y la supresión de la otra, o una modulación bimodal en la cual ocurre un efecto sobre los niveles Th1/Th2 (tales como supresión generalizada) a una alta concentración, mientras que el otro efecto (tal como la estimulación de cualquiera de Th1 ó Th2 y la supresión del otro) ocurre a una concentración baja.

[0052] En otro aspecto de esta invención, composiciones farmacéuticas que contienen un profármaco de un ligando TLR7 se administran en dosis terapéuticamente efectivas a un mamífero que está recibiendo medicamentos inmunomoduladores no incluidos en esta invención. En un aspecto preferido, las dosis del medicamento inmunomodulador se reducen por debajo de su dosis efectiva acostumbrada, para disminuir los efectos adversos. En un segundo aspecto preferido, el medicamento inmunomodulador se usa en su dosis habitual, pero con un efecto terapéutico mejorado cuando se administra además un profármaco de un ligando TLR7.

[0053] En otro aspecto de la invención, composiciones farmacéuticas que contienen un profármaco de un ligando TLR7 se administran en una dosis terapéuticamente efectiva a un mamífero que está recibiendo

medicamentos anti-infecciosos no incluidos en esta invención. En un aspecto preferido de esta invención, las composiciones farmacéuticas que contienen un profármaco de un ligando TLR7 se administran en una dosis terapéuticamente efectiva con medicamento(s) anti-infeccioso(s) que actúa(n) directamente sobre el agente infeccioso para inhibir el crecimiento del agente infeccioso, o eliminarlo.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0054] Figura 1 es una representación gráfica de los niveles plasmáticos de isatoribina e interferón α en ratones.

[0055] Figura 2 es una representación gráfica de las Variaciones de Carga Vírica en Pacientes infectados con HCV que reciben isatoribina.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5.1 DEFINICIONES

[0056] Donde en esta especificación se emplean los siguientes términos, éstos se usan como se define a continuación:

[0057] Los términos "comprende/comprenden" e "incluye/incluyen" se emplean aquí en sus sentido abierto, no limitado.

[0058] El término "nucleósido" se refiere a un compuesto conformado por cualquier fracción de pentosa o pentosa modificada, unida a una posición específica de un heterociclo o a la posición natural de una purina (posición 9-) o pirimidina (posición 1-) o a la posición equivalente en un análogo.

[0059] El término "purina" se refiere a heterociclos bicíclicos nitrogenosos.

[0060] El término "D-nucleósidos" se refiere a los compuestos de nucleósido que tienen una fracción de azúcar D-ribosa (por ejemplo, Adenosina).

[0061] El término "L-nucleósidos" se refiere a los compuestos de nucleósido que tienen una fracción de azúcar L-ribosa.

[0062] El término "immunomodulador" se refiere a productos

naturales o sintéticos capaces de modificar el sistema inmunitario normal o aberrante mediante estimulación o supresión.

[0063] El término "NOAEL" es el Nivel de Eventos Adversos No Observados, que es un término de toxicología para la dosis de medicamento que resulta en una toxicidad no significativa bajo las condiciones especificadas de nivel de dosis, frecuencia, duración en una especie seleccionada.

[0064] "Ligando" significa una molécula de bajo peso molecular capaz de unirse a un receptor biológico. Un ligando puede ser o bien un agonista o bien un antagonista, o puede no tener efecto.

[0065] Un "agonista" es un ligando que, luego de unirse, estimula al receptor a ejercer una respuesta biológica que es consistente con la actividad biológica normal del receptor.

[0066] Un "antagonista" es un ligando que, luego de unirse, hace que el receptor no ejerza la actividad biológica normal del receptor.

[0067] El término "mamífero" incluye tanto animales como humanos.

[0068] El término "previene/previenen" se refiere a la capacidad de una compuesto o composición de la invención para prevenir una enfermedad identificada aquí en mamíferos diagnosticado como portador de la enfermedad o que están en riesgo de desarrollar tal enfermedad. El término incluye igualmente prevenir la evolución posterior de la enfermedad en mamíferos que ya están sufriendo de tal enfermedad o tienen los síntomas de ella.

[0069] El término "trata/tratan" se refiere a:

(i) impedir que una enfermedad, trastorno, o dolencia ocurra en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o dolencia, pero que aún no ha sido diagnosticado como portador de ella;

(ii) inhibir la enfermedad, trastorno, o dolencia, es decir, detener su evolución; y

(iii) aliviar la enfermedad, trastorno, o dolencia, es decir, producir la regresión de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia.

[0070] Los términos "α" y "β" indican la configuración estereoquímica específica de un sustituyente en un átomo de carbono asimétrico en una estructura química tal como se representa en un esquema (***"in a chemical structure as drawn"***).

[0071] Los términos "paciente" o "sujeto" significan un animal (por ejemplo, vaca, caballo, oveja, cerdo, pollo, pavo, codorniz, gato, perro, ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, etc.) o un mamífero, incluidos animales quiméricos y transgénicos y mamíferos. En el tratamiento o prevención de infección de HCV, el término "paciente" o "sujeto" significa preferiblemente un mono o humano, muy preferiblemente un humano. En una incorporación específica el paciente o sujeto está infectado por o expuesto al virus de la hepatitis C. En ciertas incorporaciones, el paciente es un paciente humano infante (edad 0-2), niño (edad 2-12), adolescente (edad 12-17), adulto (edad 18 en adelante) o geriátrico (edad 70 en adelante). Adicionalmente, el paciente incluye pacientes inmunocomprometidos tales como pacientes VIH positivos, pacientes con cáncer, pacientes sometidos a inmunoterapia o quimioterapia. En una incorporación particular, el paciente es un individuo sano, es decir, no presenta síntomas de otras infecciones víricas.

[0072] El término una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad del ligando TLR7 o profármaco de un ligando TLR7 de la invención, suficiente para proporcionar un beneficio en el tratamiento o prevención de enfermedad vírica, retrasar o minimizar los síntomas asociados con infección vírica o enfermedad inducida por virus, o curar o aliviar la enfermedad o infección o su causa. En particular, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico *in vivo*. Usado en conexión con una cantidad de un compuesto de la invención, el término abarca preferiblemente una cantidad atóxica que mejora la terapia general, reduce o evita los síntomas o causas de la enfermedad, o intensifica la eficacia terapéutica de o las sinergias con otro agente terapéutico.

[0073] El término una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere

a una cantidad de un compuesto de la invención u otro ingrediente activo suficiente para resultar en la prevención de infección, recurrencia o difusión de infección vírica. Una cantidad profilácticamente efectiva puede referirse a una cantidad suficiente para prevenir la infección inicial o la recurrencia o difusión de la infección o una enfermedad asociada con la infección. Usado en conexión con una cantidad de un compuesto de la invención, el término incluye una cantidad atóxica que mejora la profilaxis general o intensifica la eficacia profiláctica de, o se integra con otro agente profiláctico o terapéutico.

[0074] El término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico simultánea o secuencialmente y de manera que sus respectivos efectos sean aditivos o sinérgicos.

[0075] El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas de ácidos atóxicos o bases farmacéuticamente aceptables, incluidos ácidos inorgánicos y bases y ácidos y bases orgánicos. Si el profármaco de ligando TLR7 inventivo es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse por cualquier método apropiado disponible en el arte, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un α-hidroxiácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un inorgánicos aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinnámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares. Si el profármaco de ligando TLR7 inventivo es un ácido, la sal deseada, farmacéuticamente aceptable, puede prepararse por cualquier método apropiado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal

alcalinotérreo, o similares. Ejemplos ilustrativos de sales apropiadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias, y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

[0076] El término "profármaco" tiene como fin significar cualquier entidad química que, luego de la administración, se convierte mediante acciones metabólicas o solvólisis en una entidad química diferente que conserva la actividad biológica.

[0077] El término "profármaco de ligando TLR7" tiene como fin significar cualquier entidad química que, luego de la administración, se convierte mediante acciones metabólicas o solvólisis en una entidad química diferente que conserva la actividad biológica y que es un ligando para TLR7. Un profármaco de ligando TLR7 puede ser él mismo un ligando para TLR7, o puede estar "enmascarado" en el sentido que no necesita funcionar eficientemente como un ligando TLR7.

[0078] El término "profármaco de ligando TLR7 enmascarado" tiene como fin significar cualquier entidad química que, luego de la administración, se convierte mediante acciones metabólicas o solvólisis en una entidad química diferente que conserva la actividad biológica y que es un ligando para TLR7, y donde la entidad química administrada es un ligando menos eficiente para TLR7 que la entidad química resultante de la conversión metabólica o solvólisis.

[0079] El término "un metabolito farmacéuticamente activo" tiene como fin significar un producto farmacológicamente activo producido por metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado o su sal. Luego de la entrada en el cuerpo, la mayoría de los medicamentos son sustratos para reacciones químicas que pueden cambiar sus propiedades físicas y efectos biológicos. Estas conversiones metabólicas, que usualmente afectan la polaridad del ligando TLR7, alteran el modo en que los medicamentos se distribuyen en y se excretan del cuerpo. No obstante, en algunos casos, se

requiere el metabolismo de un medicamento para obtener un efecto terapéutico. Por ejemplo, muchos medicamentos anti-neoplásicos de la clase anti-metabolito tienen que convertirse en sus formas activas, una vez se han transportado al interior de una célula cancerosa.

[0080] Tal como se emplea aquí, a menos que se especifique lo contrario, el término "alquilo" significa un hidrocarburo no cíclico de cadena recta o ramificada, saturado, que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente 1-10 átomos de carbono y, muy preferiblemente, 1-4 átomos de carbono. Alquilos representativos de cadena recta, saturados, incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octil, -n-nonilo y -n-decilo; mientras alquilos ramificados saturados incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilpentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,3-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,2-dimetilhexilo, 3,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilhexilo, 4,4-dimetilhexilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, 2-etilhexilo, 3-etilhexilo, 4-etilhexilo, 2-metil-2-etilpentilo, 2-metil-3-etilpentilo, 2-metil-4-etilpentilo, 2-metil-2-etilhexilo, 2-metil-3-etilhexilo, 2-metil-4-etilhexilo, 2,2-dietilpentilo, 3,3-dietilhexilo, 2,2-dietilhexilo, 3,3-dietilhexilo y similares. Un grupo alquilo puede ser sustituido o no sustituido.

[0081] Tal como se emplea aquí, a menos que se especifique lo contrario, el término "arilo" significa un anillo aromático carbocíclico que contiene desde 5 a 14 átomos de anillo. Los átomos de anillo de un grupo arilo carbocíclico son todos átomos de carbono. Estructuras de anillo arilo incluyen compuestos que poseen una o más estructuras de anillo tales como compuestos mono-, bi-, o tricíclicos así como fracciones carbocíclicas benzo-fusionadas tales como 5,6,7,8-tetrahidronaftilo y similares. Preferiblemente, el grupo arilo es un anillo monocíclico o un anillo bicíclico. Grupos representativos arilo incluyen fenilo, tolilo, antracenilo, fluorenilo, indenilo, azulenilo, fenantrenilo y naftilo. Un grupo arilo

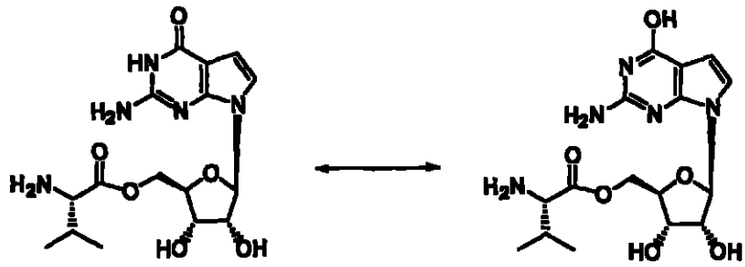
carbocíclico puede ser sustituido o no sustituido.

[0082] El término "sustituido" significa que el grupo especificado o fracción lleva uno o más sustituyentes. El término "no sustituido" significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. Un "alquilo sustituido" o "arilo sustituido" se sustituye por uno o más sustituyentes incluidos halógeno (F, Cl, Br, ó I), (C_{1-6}) alquilo inferior, -OH, -NO_2, -CN, -CO_2H, -O- alquilo inferior, -arilo, -arilo-alquilo inferior, -CO_2CH_3, -$CONH_2$, -OCH_2CONH_2, -NH_2, -SO_2NH_2, haloalquilo (por ejemplo, -CF_3, -CH_2CF_3), -O-haloalquilo (por ejemplo, -OCF_3, -$OCHF_2$), y similares.

[0083] Tal como se emplea aquí y, a menos que se indique lo contrario, el término "ópticamente pura" o "estereoméricamente pura" significa una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto que está sustancialmente libre de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, un compuesto estereoméricamente puro con un centro quiral estará sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto típico, estereoméricamente puro comprende más de alrededor de 80% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor de 20% en peso de otros estereoisómeros del compuesto, más preferiblemente más de alrededor de 90% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor de 10% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, aún más preferiblemente más de alrededor de 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor de 5% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto y, muy preferiblemente más de alrededor de 97% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor de 3% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Puesto que muchos de los compuestos de la invención comprenden sacáridos que pueden existir en cualquiera de las dos formas D o L, la invención incluye cualquiera, o ambos azúcares D y L. Como tales, por ejemplo, un azúcar D estereoméricamente puro estará sustancialmente libre de la forma L. En una incorporación alternativa, el uso de formas L de un ligando TLR7 estará sustancialmente libre de la forma D. Por consiguiente, los métodos y composiciones divulgados aquí

incluyen en una incorporación alternativa el uso de tales azúcares levorrotatorios o poloímeros elaborados de ellos.

[0084] Los compuestos de la invención pueden exhibir el fenómeno del tautomerismo. Aunque las Fórmulas I y II no pueden describir expresamente todas las formas tautoméricas posibles, hay que entender que Fórmula I tiene como fin representar cualquier forma tautomérica del compuesto descrito y no tiene que limitarse meramente a una forma específica de un compuesto descrito por los dibujos de la fórmula. Por ejemplo, se entiende que independientemente de si los sustituyentes se muestran o no en su forma enol o su forma ceto, éstos representan el mismo compuesto (como se indica en el Ejemplo de Fórmula IIa a continuación).



5.2 Identificación de Ligandos TLR7

[0085] Ligandos conocidos de TLR7 incluyen, pero no se limitan a (1) análogos de guanosina, tales como 7-deazaguanosina y compuestos relacionados, incluidos, pero no limitados a los descritos en Townsend, *J. Heterocyclic Chem,* 13, 1363 (1976), y Seela, *et al., Chem. Ber.,* 114(10), 3395-3402 (1981); 7-alil, 8-oxo-guanosina (loxorabina) y compuestos relacionados, incluidos, pero no limitados a los descritos en Reitz, *et al., J. Med. Chem,* 37, 3561-3578 (1994); 7-metilo, 9-deazaguanosina y compuestos relacionados incluidos, pero no limitados a, los descritos en Girgis *et al., J. Med. Chem.,* 33, 2750-2755 (1990); 8-bromoguanosina y otros compuestos de purinas 8-halógeno sustituidas incluidos, pero no limitados a, los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4,643,992; 6-amino-9-bencil-2-butoxi-9*H*-purin-8-ol, y otras purinas 2, 6, 8, 9 –sustituidas incluidas, pero no limitadas a, las descritas en Hirota *et al., J. Med. Chem.,* 45, 5419-5422 (2002), Henry *et al., J. Med. Chem., 33,* 2127-

2130 (1990), Michael *et al., J. Med Chem.*, 36, 3431-3436 (1993), Furneaux *et al., J. Org. Chem.*, 64 (22), 8411-8412 (1999), Barrio *et al; J. Org. Chem.*, 61, 6084-6085 (1996), Patente de los Estados Unidos No. 4,539,205, Patente de los Estados Unidos No. 5,011,828, Patente de los Estados Unidos No. 5,041,426, Patente de los Estados Unidos No. 4,880,784, y Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/07904; (2) imidazoquinolinas, incluidos, pero no limitados a 1-(4-amino-2-etoximetil-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-il)-2-metil-propan-2-ol (imiquimoid), como se describe en Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/17043; 1-isobutil-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-ilamina (resiquimoid) como se describe en Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/17043 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/357,777 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0195209), 10/357,733 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0186949), 10/358,017(Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0176458), 10/357,995 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0162806), 10/165,222 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0100764), 10/011,921 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0065005) y 10/013,059 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2002/0173655); Patente de los Estados Unidos No. 5,395,937; Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 98/17279; y (3) derivados de pirimidina, incluidos, pero no limitados a 2-amino-6-bromo-5-fenil-3*H*-pirimidin-4-ona (bropirimina), y pirimidinas similares sustituidas incluidas, pero no limitadas a, las descritas en Wierenga *et al., J. Med. Chem*, 23, 239-240 (1980), Fan *et al., J. Heterocyclic Chem.*, 30, 1273 (1993), Skilnick *et al., J. Med. Chem.*, 29, 1499-1504 (1986), Fried, *et al., J. Med. Chem.*, 23, 237-239 (1980), y Fujiwara *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10(12) 1317-1320 (2000). La totalidad de cada una de las patentes, publicaciones de patente y publicaciones identificadas aquí se incorporan en esta especificación por

referencia.

[0086] Además de los anteriores ligandos TLR7, ligandos adicionales de TLR7 pueden identificarse fácilmente por métodos conocidos de cribado conocidos. Véase, por ejemplo, Hirota *et al., J. Med. Chem.*, 45, 5419-5422 (2002); y Akira S. *et al., Immunology Letters,* 85, 85-95 (2003). Usando una variante de uno de estos métodos conocidos de cribado (como se describe en Sección 6.1), análogos y derivados de adenina se identificaron igualmente como ligandos TLR7. Los derivados de adenina conocidos en el arte se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente Europea No. EP 1 035 123, EP 1 043 021, y EP 0 882 727; Patente de los Estados Unidos No. 6,376,501; Patente de los Estados Unidos No. 6,329,381; Patente de los Estados Unidos No.6,028,076, y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0162806.

[0087] Los ligandos TLR7s de Fórmulas Ia-Ih pueden sintetizarse usando métodos conocidos por una persona experta en el arte, particularmente a la luz de las referencias y patentes ya enumeradas.

5.3 Preparación de Profármacos de Ligando TLR7

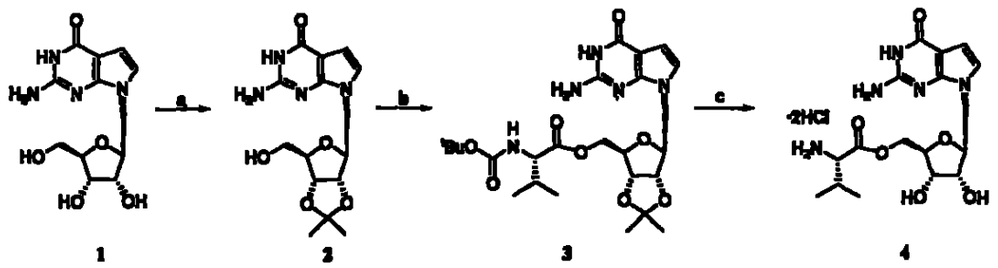
[0088] El profármaco de ligando TLR7s de la invención se preparan elaborando (a) una fracción amida, carbamato, o amidina luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, carbonato, carbamato, éter, imidato, acetal, o cetal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de TLR7, (c) una fracción acetal o cetal luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (d) una fracción imidato luego de la conversión de un carbonilo de ligando TLR7 de un sustituyente amido, (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un sustituyente oxo de ligando TLR7 de pirimidina o guanosina, o (f) una amina. Por ejemplo, profármacos de ligando TLR7 se preparan o bien (1) convirtiendo un sustituyente hidroxilo (OH) del ligando TLR7 en un éster de aminoácido, o (2) elaborando un sustituyente amina del ligando TLR7 en una amida o carbamato. El proceso para preparar profármacos es bien conocido en el arte y se describe por *Burger's*

Medicinal Chemistry and Drug Chemistry, 1, 172-178, 949-982 (1995). Véase también Bertolini *et al., J. Med. Chem.,* 40, 2011-2016 (1997); Shan, *et al., J. Pharm. Sci.,* 86 (7), 765-767; Bagshawe, *Drug Dev. Res.,* 34, 220-230 (1995); Bodor, *Advances in Drug Res.,* 13, 224-331 (1984); Bundgaard, *Design of Profármacos* (Elsevier Press 1985); Larsen, *Design and Application of Profármacos,* Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen *et al.,* eds., Harwood Academic Publishers, 1991); Dear *et al., J. Chromatogr. B,* 748, 281-293 (2000); Spraul *et al., J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis,* 10, 601-605 (1992); y Prox *et al., Xenobiol,* 3,103-112 (1992).

[0089] Los Esquemas 1-18 muestran un procedimiento general para preparar compuestos representativos de Fórmula II.

[0090] Los esquemas 1-6 describen cómo pueden sintetizarse ésteres de 5'-aminoácido a partir de análogos y derivados de guanosina.

Esquema 1



1 2 3 4

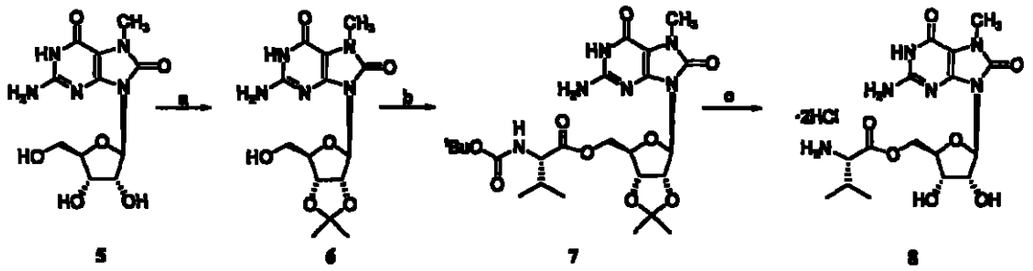
Townsend, *JHC,* 13, 1976, 1363
Seela, et al, *Chem. Ber.,* 114, *10,* 1981, 3395-3402

a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C

b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C – rt (temperatura de la sala)

c) HCl anhidro, *i*PrOAc, *i*PrOH

Esquema 2



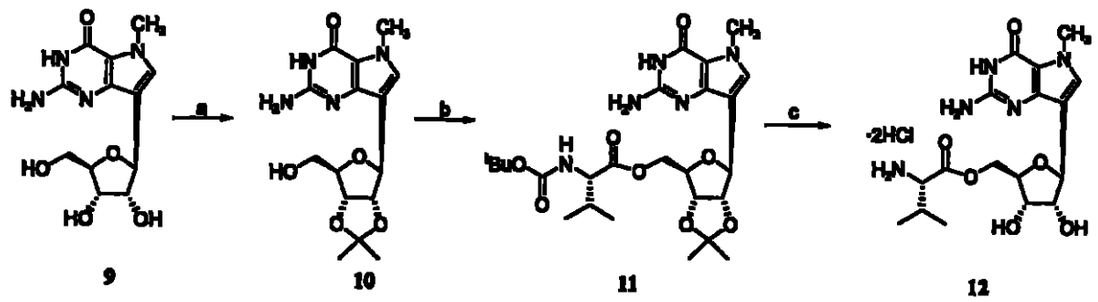
Reitz, et al, *JMC.* 37, 1994, 3561-3578

a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C

b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C – rt

c) HCl anhidro, *i*PrOAc, *i*PrOH

Esquema 3



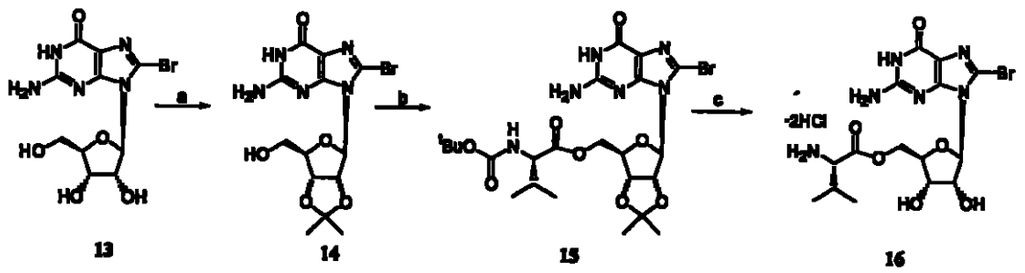
Girgis, et al, *JMC.* 33, 1990, 2750-2755

a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C

b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt

c) HCl anhidro, *i*PrOAc, *i*PrOH

Esquema 4



8-bromoguanosina [303136-79-0]
disponible en el comercio

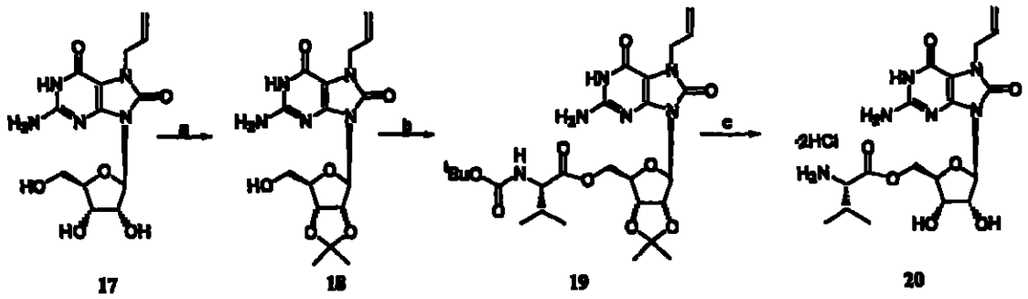
a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C

b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt

c) HCl anhidro, *i*PrOAc, *i*PrOH

[0091] En una ruta sintética típica, los grupos 2',3'-hidroxilo de la fracción β-D-ribosa de Fórmula Ia, Ib, Id, Ie, o Ih pueden protegerse primero, preferiblemente con un acetónido como se indica para **2, 6, 10,** ó **14.** El 5'-hidroxilo libre puede someterse entonces a una variedad de métodos de esterificación con un aminoácido *N*-protegido para formar **3, 7, 11,** ó **15.** El nitrógeno del éster de aminoácido y los 2',3'-hidroxilos de la unidad ribosa pueden someterse luego a varias condiciones de desprotección, preferiblemente en forma concurrente, seguidas por formación de sal de la amina libre del éster de aminoácido, como se ilustra para **4, 8, 12,** ó **16.**

Esquema 5



17 18 19 20

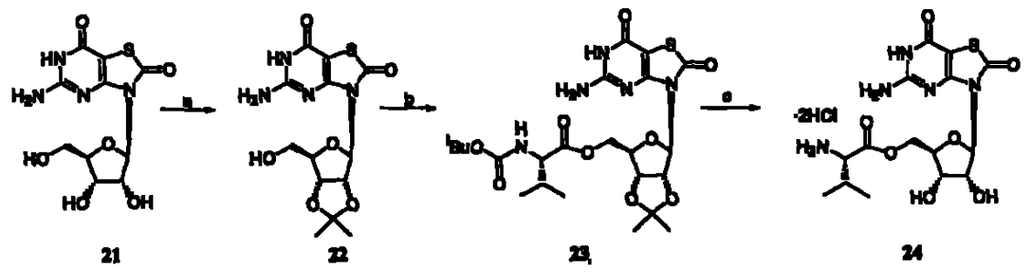
Reitz, et al, *JMC*, 37, 1994, 3561-3578

a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMF, $MeSO_3H$, 0 °C

b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt

c)AcCl, CH_3OH

Esquema 6



21 22 23 24

Kini, et al. *JMC*, 34, 1991, 3006-3010

a) 2,2-dimetoxipropano, acetona, DMSO, $MeSO_3H$, 0 °C

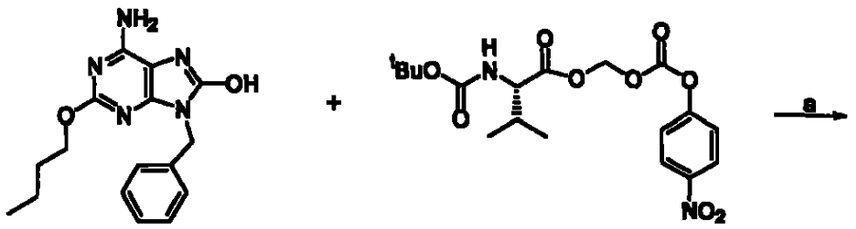
b) BOC-NHCHR$^1CO_2H$, EDC, DMAP, PhMe, 0 °C - rt

c) HCl anhidro, *i*PrOAc, *i*PrOH

[0092] En las rutas sintéticas mostradas en Esquemas 5 y 6, los grupos 2',3'-hidroxilo de la fracción β-D-ribosa del compuesto **17** y **21** se protegieron primero con un acetónido para formar **18** y **22** respectivamente. El 5'-hidroxilo libre se sometió entonces a esterificación con valina de *N*-terc-butoxicarbonilo para formar **19** y **23** respectivamente. El nitrógeno del éster de aminoácido y los 2',3'-hidroxilos de la ribosa se desprotegieron concurrentemente formando las sales clorhidrato como se ilustra para **20** y **24**.

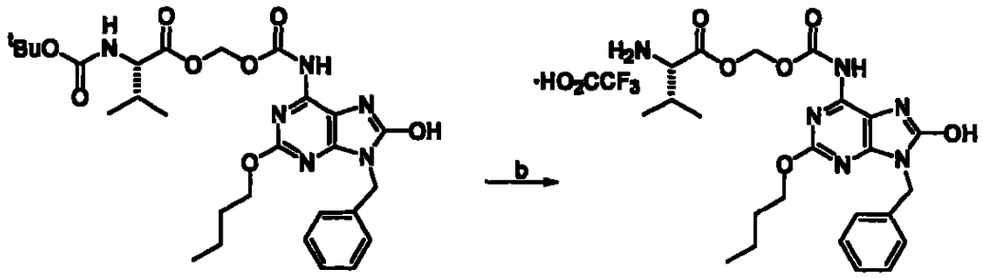
[0093] Esquemas 7 y 8 describen cómo se pueden sintetizar carbamatos y carbonatos a partir de análogos y derivados de adenina.

Esquema 7



25 Hirota, et al, *JMC*, 45, 2002, 5419-5422

26 Gangwar, et al, *JOC*, 62, 1997, 1358-1362



27

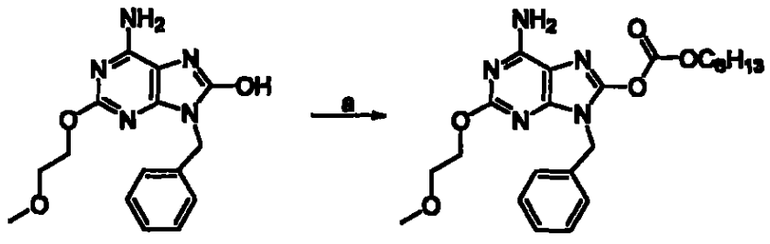
28 (Ejemplo de IIf)

a) HOBT, DMF,CH_2Cl_2, 0 °C

b) TFA, CH_2ClI_2, 0 °C – rt

[0094] En una ruta sintética típica, el grupo amino de Fórmula **If** puede someterse a una variedad de condiciones con carbonatos o cloroformiatos para formar carbamatos. En el caso de **27**, la amina protegida N-terminal del éster de aminoácido resultante puede someterse a condiciones de desprotección para formar sales tales como **28**.

Esquema 8



29 30

Kurimòta, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2004, p.1091-1099

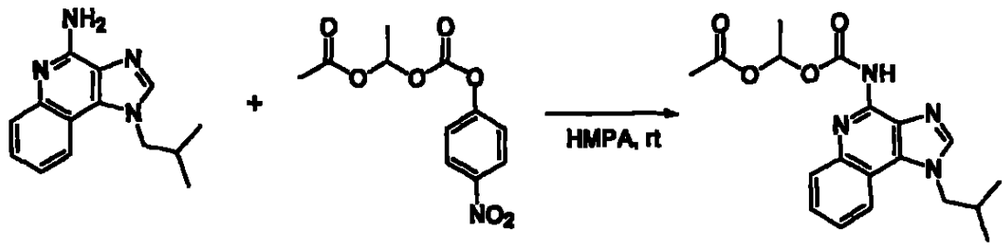
a) $C_6H_{13}OC(O)Cl$, $(iPr)_2NEt$, CH_2Cl_2, MeOH, DMAP, 0-35 °C

[0095] En Esquema 8 el grupo hidroxilo del derivado de adenina **29** se

esterificó con n-hexil cloroformiato para producir carbonato **30**.

[0096] Esquemas 9 y 10 describe cómo pueden sintetizarse carbamatos a partir de análogos de imidazoquinolina.

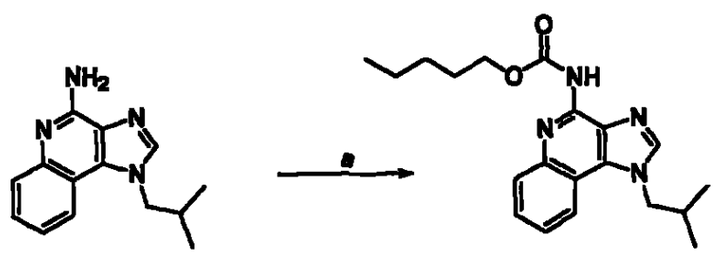
Esquema 9



31 Nicolaides et al, WO 94/17043 **32** Alexander, et al, *JMC*, 31, 1988, 318-322 **33 (Ejemplo de IIc)**

[0097] En una ruta sintética típica, el grupo amino de los análogos de Fórmula **Ic** puede someterse a una variedad de condiciones con carbonatos, pirocarbonatos o cloroformiatos para formar carbamatos.

Esquema 10



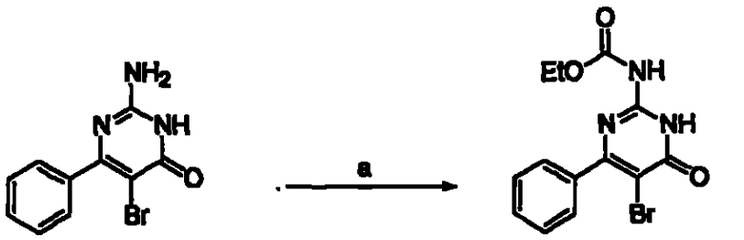
31 Nicolaides et al, WO 94/17043 **34**

a) $[C_5H_{11}OC(O)]_2O$, NEt_3, $CHCl_3$, 40 °C

[0098] En esquema 10 imidazoquinolina **31** se trató con n-pentil pirocarbonato para producir pentil carbamato 34.

[0099] Esquemas 11-12 describen cómo sintetizar carbamatos e imidatos de pirimidinas de fórmula **Ig**.

Esquema 11



35

Wierenga et al, *JMC*, 23, 1980, 239-240

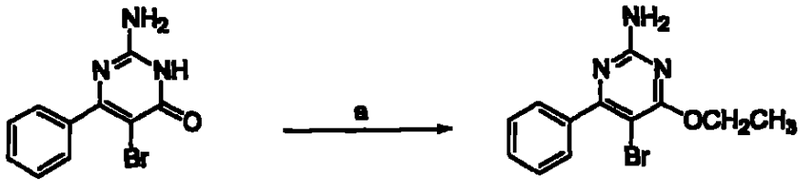
36 (Ejemplo de IIg)

Fan et al, *JHC*, 30, 1993, 1273-1276

a) $[EtO(CO)]_2O$, NEt_3, DMF, 65 °C

[00100] En una síntesis típica de carbamatos, el grupo amino de **35** se sometió a etil pirocarbonato bajo condiciones indicadas más arriba para formar carbamato **36**.

Esquema 12



35

Wierenga et al, *JMC*, 23, 1980, 239-240

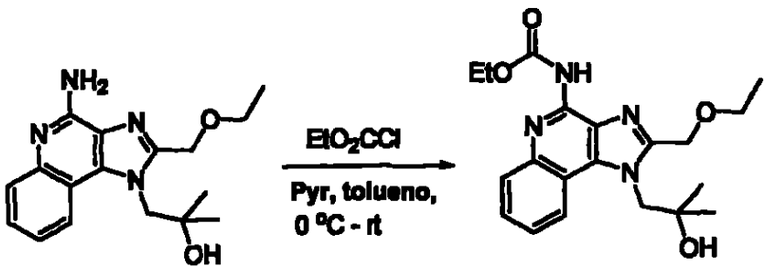
37 (Ejemplo de IIg)

a) PPh_3 soportada en polímero, EtOH, DEAD, THF, rt

[00101] En una síntesis típica de imidatos, el grupo amino de **35** se sometió a alcohol etílico bajo condiciones tipo Mitsunobu indicadas más arriba para formar derivado etoxi **37**.

[00102] Esquema 13 describe cómo pueden sintetizarse carbamatos a partir de análogos de imidazoquinolina.

Esquema 13



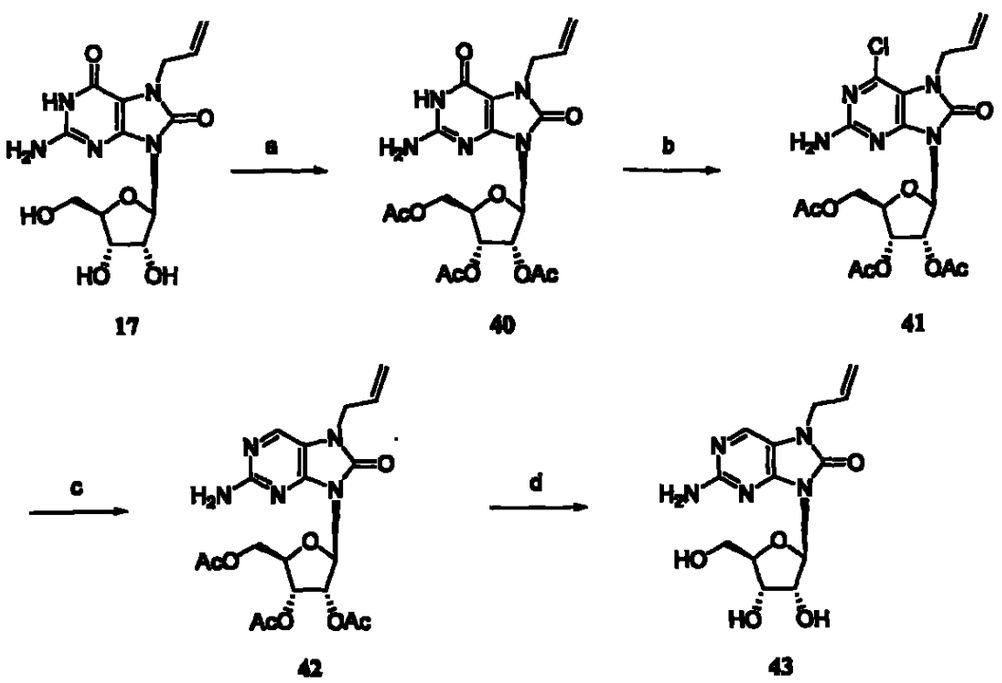
38 Nicolaides, et al, WO 94/17043

39 (Ejemplo de IIc)

[00103] En una ruta sintética típica, el grupo amino de un derivado de Fórmula Ic puede someterse a una variedad de condiciones con carbonatos, pirocarbonatos o cloroformiatos para formar carbamatos.

[00104] Esquema 14 muestra un procedimiento general para preparar 7-alil-2-Amino-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona.

Esquema 14



17 40 41

42 43

a) Ac_2O, DMAP, NEt_3, CH_3CN

b) $POCl_3$, 75 °C

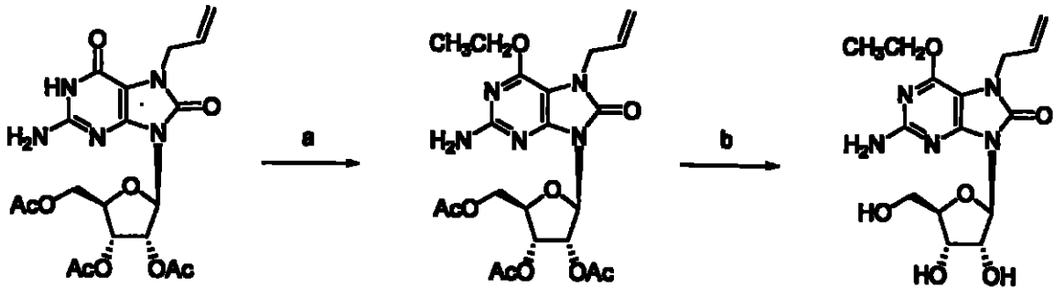
c) Zn-Cu, AcOH, 70 °C

d) K_2CO_3, CH_3OH, rt

[00105] En rutas sintéticas típicas, 7-alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-1*H*-purin-6,8-diona **17**, protegida en los grupos 2',3',5'-hidroxilo de la β-D-ribosa, preferiblemente con grupos acilo como se indica para **40**, puede someterse a una variedad de condiciones para convertir el carbonilo en la posición C-6 en varios grupos, incluidos, pero no limitados a halógeno, como se muestra para **41**, que son susceptibles a reducción. Luego de la reducción bajo condiciones de reacción hetero- u homogénea, los 2',3',5'-hidroxilos de la unidad ribosa se someten entonces a condiciones apropiadas de desprotección, para producir **43**. Compuesto **43** puede modificarse adicionalmente en forma apropiada, si se desea.

[00106] Esquema 15 muestra un procedimiento general para preparar 7-allil-2-Amino-6-etoxi-9-*β*-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona.

Esquema 15



40 **44** **45**

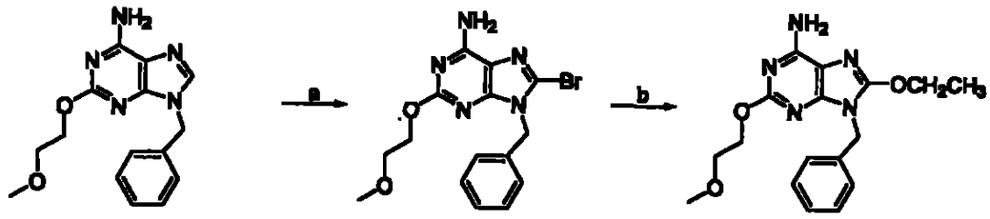
a) PPh_3 soportada en polímero, EtOH, DEAD, THF, rt

b) K_2CO_3, CH_3OH, rt

[00107] En una ruta sintética típica, **40** puede someterse a una variedad de condiciones para convertir el carbonilo en la posición C-6 en varios imidoéteres, incluidos, pero no limitados a etilo, como se indica para **44**. Los 2',3',5'-hidroxilos de la unidad ribosa se someten entonces a condiciones apropiadas de desprotección, para producir **45**. Posteriormente, compuesto **45** puede modificarse en forma apropiada, si se desea.

[00108] Esquema 16 describe cómo pueden sintetizarse éteres a partir de análogos y derivados de adenina.

Esquema 16



62 63 64

Kurimota, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2004, p.1091-1099

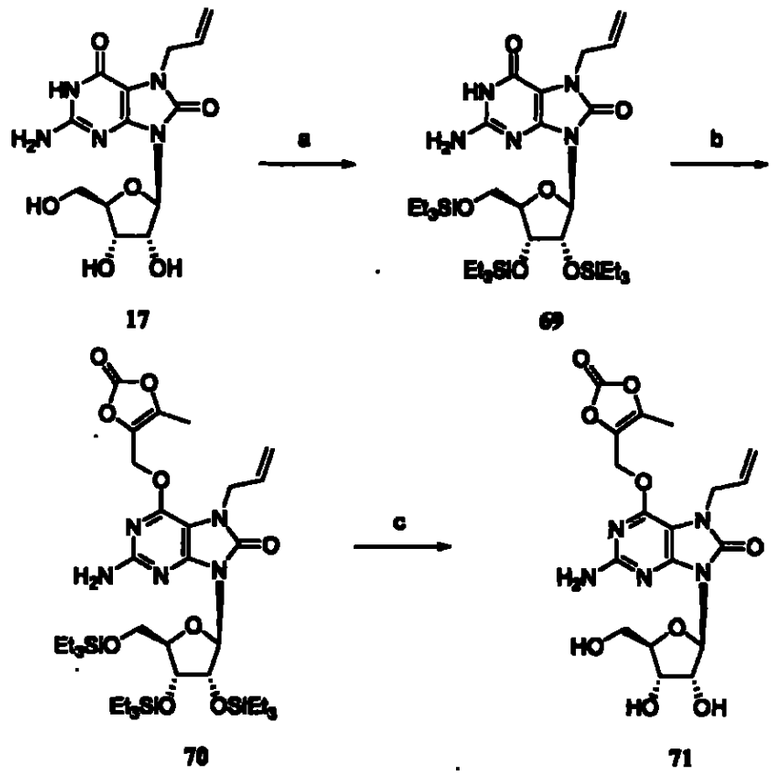
a) Br_2, CH_2Cl_2

b) NaOEt, EtOH

[00109] En una ruta sintética típica, el derivado de adenina puede halogenarse en C-8. El halógeno puede desplazarse entonces con un alcóxido apropiado para formar derivados tales como **64**.

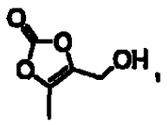
[00110] Esquema 17 muestra un procedimiento general para preparar alcoxi-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-onas 7-alil-2-amino-6-sustituidas.

Esquema 17



17 69 70 71

a) Et_3SiCl, imidazol, DMF, rt

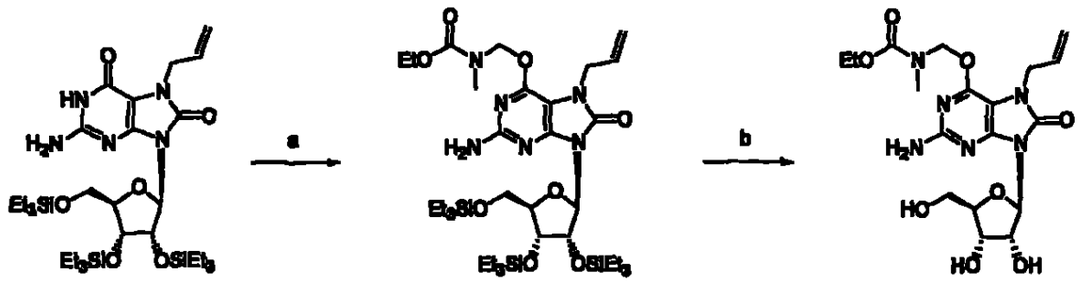
b)  , PPh_3 soportada en polímero, DEAD, THF, rt

c) HF-NEt_3, CH_3OH, rt

[00111] En una ruta sintética típica, los grupos hidroxilo en la ribosa de **17** pueden protegerse como éteres de sililo. El carbonilo en la posición C-6 de **69** puede someterse a una variedad de condiciones para convertir el carbonilo a varios imido-éteres, incluidos, pero no limitados al éter de 4-hidroximetil-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona, como se muestra para **70**. Los 2',3',5'-hidroxilos de la unidad de ribosa pueden someterse entonces a condiciones apropiadas de desprotección para producir **71**.

[00112] Esquema 18 muestra un procedimiento general para preparar alcoxi-9-β-*D*-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-onas 7-alil-2-amino-6-sustituidas.

Esquema 18



69 **72** **73**

a) $HOCH_2N(CH_3)CO_2Et$, PPh_3 soportada en polímero, DEAD, THF, rt

b) HF-NEt_3, CH_3OH, rt

[00113] El carbonilo en la posición C-6 de **69** puede someterse a una variedad de condiciones para convertir el carbonilo en varios imido-éteres, incluidos, pero no limitados al éter de *N*-metil-N-(hidroximetil)uretano, como se muestra para **72**. Los 2',3',5'-hidroxilos de la unidad de ribosa pueden someterse entonces a condiciones apropiadas de desprotección para

producir 73. Posteriormente, compuesto 73 puede modificarse en forma apropiada, si se desea.

5.4 MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE INFECCIONES VÍRICAS POR HEPATITIS C

[00114] La presente invención provee métodos para tratar o prevenir una infección por el virus de hepatitis C en un paciente necesitado de ello.

[00115] La presente invención provee además métodos para introducir una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando TLR7 o su profármaco, o combinación de tales ligandos y profármacos en el torrente sanguíneo de un paciente en el tratamiento y/o prevención de infecciones víricas por hepatitis C.

[00116] La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de un ligando TLR7 o profármaco de ligando TLR7 de la invención o su sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable en el tratamiento o prevención crónico o agudo de una infección variará, no obstante, con la naturaleza y gravedad de la infección, y la vía por la cual se administra el ingrediente activo. La dosis y, en algunos casos, la frecuencia de la dosis, variará también de acuerdo con la infección por tratarse, la edad, el peso corporal, y la respuesta del paciente individual. Regímenes posológicos apropiados pueden seleccionarse fácilmente por aquellas personas expertas en el arte, con la debida consideración de tales factores.

[00117] Los métodos de la presente invención se adaptan particularmente bien para pacientes humanos. En particular, los métodos y dosis de la presente invención pueden ser útiles para pacientes inmunocomprometidos incluidos, pero no limitados a pacientes con cáncer, pacientes infectados con HIV, y pacientes con una enfermedad inmunodegenerativa. Más aún, los métodos pueden ser útiles para pacientes inmunocomprometidos actualmente en un estado de remisión. Los métodos y dosis de la presente invención son también útiles para pacientes que están siendo sometidos a tratamientos antivíricos. Los métodos de prevención de

la presente invención son particularmente útiles para pacientes con riesgo de infección vírica. Estos pacientes incluyen, pero no se limitan a trabajadores de la salud pública, por ejemplo, doctores, enfermeras, personal de cuidados paliativos (***"hospice care givers"***); personal militar; maestros; trabajadores en cuidado infantil; pacientes que viajan a, o viven en, localidades extranjeras, en particular localidades del tercer mundo incluidos trabajadores de asistencia social, misioneros, y diplomados extranjeros. Finalmente, los métodos y composiciones incluyen el tratamiento de pacientes renuentes o pacientes resistentes a tratamiento, tal como resistencia a inhibidores de polimerasa vírica, inhibidores de proteasa, etc.

Dosis

[00118] La toxicidad y eficacia de los compuestos de la invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, *por ejemplo,* para determinar la LD_{50} (la dosis letal al 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y éste puede expresarse como la relación LD_{50}/ED_{50}.

[00119] Los datos obtenidos de los análisis de cultivos celulares y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de posología de los compuestos para empleo en humanos. La posología de tales compuestos se sitúa preferiblemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La posología puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede calcularse inicialmente de análisis de cultivos de células. Puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar una concentración plasmática en circulación que incluya la IC_{50} (*es decir*, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima de la mitad de los síntomas) como se determina en un cultivo de células; alternativamente, la

dosis del profármaco de ligando TLR7 puede formularse en modelos animales para alcanzar una concentración plasmática en circulación del ligando TLR7 que corresponda a la concentración requerida para lograr una magnitud fija de respuesta. Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en humanos. Los niveles en el plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

[00120] Los protocolos y composiciones de la invención se prueban preferiblemente *in vitro*, y luego *in vivo*, con respecto a la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su empleo en humanos. Por ejemplo, los análisis *in vitro*, que pueden usarse para determinar si la administración de un protocolo terapéutico específico es indicado o no, incluyen análisis de cultivo de células *in vitro* en los cuales células que son sensibles a los efectos de los ligandos TLR7s se exponen al ligando y se mide la magnitud de respuesta mediante una técnica apropiada. A continuación se evalúa la potencia del ligando TLR7 con respecto a la potencia del profármaco de ligando TLR7, y el grado de conversión del profármaco de ligando TLR7. Los compuestos para uso en métodos de la invención pueden probarse en sistemas de modelos animales apropiados antes de probarlos en humanos, incluidos, pero sin limitación, en ratas, ratones, aves, vacas, monos, conejos, hámsters, etc. Los compuestos pueden usarse entonces en los análisis clínicos apropiados.

[00121] La magnitud de una dosis terapéutica o profilática de un profármaco de un ligando TLR7 de la invención o su sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable en el tratamiento o prevención aguada o crónica de una infección o dolencia variarán con la naturaleza y gravedad de la infección, y la vía por la cual se administra el ingrediente activo. La dosis y, posiblemente, la frecuencia, variarán de acuerdo con la infección por tratarse, la edad, peso corporal, y respuesta del paciente individual. Regímenes de posología apropiados pueden seleccionarse por aquellas personas expertas en el arte con debida consideración de tales factores. En una incorporación, la dosis administrada depende del

compuesto específico por usarse, y del peso y condición del paciente. Además, la dosis puede diferir para varios profármacos de ligandos TLR7 particulares; pueden preverse dosis apropiadas sobre la base de las mediciones ya mencionadas *in vitro*, en particular para uso de tales mediciones del ligando TLR7 con la cual se relaciona el profármaco de ligando TLR7, y sobre la base de estudios animales, de modo que dosis más pequeñas serán adecuadas para aquellos profármacos de ligando TLR7 que muestran efectividad en concentraciones más bajas que otros profármacos de ligando TLR7 cuando se miden en los sistemas descritos o referenciados aquí. En general, la dosis diaria está en el intervalo de desde alrededor de 0.001 a 100 mg/kg, preferiblemente alrededor de 1 a 25 mg/kg, más preferiblemente alrededor de 5 a 15 mg/kg. para tratamiento de humanos infectados por virus de la hepatitis C, alrededor de 0.1 mg a alrededor de 15 g al día se administran en alrededor de una a cuatro divisiones al día, preferiblemente 100 mg a 12 g al día, más preferiblemente desde 100 mg a 8.000 mg al día. En una incorporación preferida para compuestos tales como profármacos de 3-β-D-ribofuranosiltiazolo[4,5-d]pirimidinas desde 200 mg a 8.000 mg al día se administran en alrededor de una a cuatro divisiones al día. Adicionalmente, la dosis diaria recomendada puede administrarse en ciclos como agentes individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. En una incorporación, la dosis diaria se administra en una sola dosis o en dosis igualmente divididas. En una incorporación relacionada, la dosis diaria recomendada puede administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana.

[00122] En una incorporación preferida, los compuestos de la invención se administran para proporcionar distribución sistémica del compuesto en el paciente. En una incorporación relacionada, los compuestos de la invención se administran para producir un efecto sistémico en el cuerpo.

[00123] En otra incorporación los compuestos de la invención se administran vía oral, mucosal (incluida la mucosa sublingual, oral, rectal, nasal, o vaginal), parenteral (incluida subcutánea, intramuscular, inyección

intravenosa rápida, intraarterial, o intravenosa), transdérmica, o tópica. En una incorporación específica los compuestos de la invención se administran por vía mucosal (incluidas la mucosa sublingual, oral, rectal, nasal, o vaginal), parenteral (incluida subcutánea, intramuscular, inyección intravenosa rápida, intraarterial, o intravenosa), transdérmica, o tópica. En otra incorporación específica, los compuestos de la invención se administran por vía oral. En otra incorporación específica, los compuestos de la invención no se administran por vía oral.

[00124] Diferentes cantidades terapéuticamente efectivas pueden ser aplicables para diferentes infecciones, como se conocerá fácilmente por aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte. Análogamente, cantidades suficientes para tratar o prevenir tales infecciones, pero insuficientes para causar, o suficientes para reducir, efectos adversos asociados con terapias convencionales se abarcan también por las cantidades de posología ya descritas y los horarios de frecuencia de dosis.

Terapia de Combinación

[00125] Métodos específicos de la invención comprenden además la administración de un agente terapéutico adicional (*es decir*, un agente terapéutico distinto de un compuesto de la invención). En ciertas incorporaciones de la presente invención, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con por lo menos uno otro agente terapéutico. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a antibióticos, agentes antieméticos, antidepresivos, y agentes antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, agentes antineoplásicos, agentes inmunomoduladores, β-interferones, agentes alquilantes, hormonas o citocinas. En una incorporación preferida la invención comprende la administración de un agente terapéutico adicional que es específico de HCV o demuestra actividad anti-HCV.

[00126] Los profármacos de ligando TLR7 de la invención puede administrarse o formularse en combinación con antibióticos. Por ejemplo, pueden formularse con un macrólido (*por ejemplo*, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (*por ejemplo*, cefalexina (Keflex®), cefradina

(Velosef®), cefuroxime (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixime (Suprax®) o cefadroxil (Duricef®)), una claritromicina (*por ejemplo*, claritromicina (Biaxin®)), una ertromicina (*por ejemplo*, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (*por ejemplo*, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolon (*por ejemplo*, ofioxacina (Floxin®), ciprofloxacina (Cipro®) o norfloxacina (Noroxin®)), antibióticos de aminoglicósido (*por ejemplo*, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, y espectinomicina), antibióticos de anfenicol (*por ejemplo*, azidamfenicol, cloramfenicol, florfenicol, y tianfenicol), antibióticos de ansamicina (*por ejemplo*, rifamida y rifampina), carbacefemos (*por ejemplo*, loracarbef), carbapenems (*por ejemplo*, biapenem e imipenem), cefalosporinas (*por ejemplo*, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, y cefpirome), cefamicinas (*por ejemplo*, cefbuperazona, cefmetazol, y cefminox), monobactams (*por ejemplo*, aztreonam, carumonam, y tigemonam), oxacefemos (*por ejemplo*, flomoxef, y moxalactama), penicilinas (*por ejemplo*, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamccilina, hidroyoduro de penetamato, o-benetamina de penicilin, penicilina 0, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina, y fencihicilina potásica), lincosamidas (*por ejemplo*, clindamicina, y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (penicilina apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (*por ejemplo*, brodimoprim), nitrofuranos (*por ejemplo*, furaltadona, y cloruro de furazolio), quinolonas sus análogos (*por ejemplo*, cinoxacina, clinafloxacina, flumequina, y grepagloxacina), sulfonamidas (*por ejemplo*, acetilsulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina, y sulfacitina), sulfonas (*por ejemplo*, diatimosulfona, glucosulfona sódica, y solasulfona), cicloserina, mupirocina

y tuberina.

[00127] Los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse igualmente en combinación con un agente antiemético. Agentes antieméticos apropiados incluyen, pero no se limitan a ametoclopromida, domperidona, proclorperazina, prometazina, clorpromazina, trimetobenzamida, ondansetron, granisetron, hidroxizina, acetileucina monoetanolamina, alizapride, azasetron, benzquinamida, bietanautina, bromopride, buclizina, clebopride, ciclizina, dimenhidrinato, difenidol, dolasetron, meclizina, methallatal, metopimazina, nabilona, oxiperndil, pipamazina, escopolamina, sulpirida, tetrahidrocannabinoles, tietilperazina, tioproperazina, tropisetron, y sus mezclas.

[00128] Los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un antidepresivo. Antidepresivos apropiados incluyen, pero no se limitan a, binedalina, caroxazona, citalopram, dimetazan, fencamina, indalpina, indeloxazina clorhidrato, nefopam, nomifensina, oxitriptan, oxipertina, paroxetina, sertralina, tiazesim, trazodona, benmoxina, iproclozida, iproniazida, isocarboxazida, nialamida, octamoxina, fenelzina, cotinina, roliciprina, rolipram, maprotilina, metralindol, mianserina, mirtazepina, adinazolam, amitriptilina, óxido de amitriptilina, amoxapina, butriptilina, clomipramina, demexiptilina, desipramina, dibenzepina, dimetacrina, dotiepina, doxepina, fluacizina, imipramina, imipramina N-óxido, iprindol, lofepramina, melitracen, metapramina, nortriptilina, noxiptilina, opipramol, pizotilina, propizepina, protriptilina, quinupramina, tianeptina, trimipramina, adrafinil, benactizina, bupropion, butacetina, dioxadrol, duloxetina, etoperidona, febarbamate, femoxetina, fenpentadiol, fluoxetina, fluvoxamina, hematoporfirina, hipericina, levofacetoperane, medifoxamina, milnacipran, minaprina, moclobemide, nefazodona, oxaflozano, piberalina, prolintano, pirisuccideanol, ritanserina, roxindole cloruro de rubidio, sulpirida, tandospirona, tozalinona, tofenacina, toloxatona, tranilcipromina, L-triptófano, venlafaxina, viloxazina, y zimeldina.

[00129] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la

invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente antifúngico. Agentes antifúngicos apropiados incluyen pero no se limitan a anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intrathecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrin, naftifina, terbinafina, undecilenato, y griseofuldina.

[00130] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente antiinflamatorio. Agentes antiinflamatorios útiles incluyen, pero no se limitan a medicamentos antiinflamatorios no esteroideos tales como ácido salicílicos, ácido acetilsalicílico, metilsalicilato, diflunisal, salsalate, olsalazina, sulfasalazina, acetaminofén, indometacina, sulindac, etodolac, ácido mefenámico, meclofenamato sódico, tolmetina, ketorolac, diclofenac, ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbinprofeno, oxaprozina, piroxicam, meloxicam, ampiroxicam, droxicam, pivoxicam, tenoxicam, nabumetome, fenilbutazona, oxifenbutazona, antipirina, aminopirina, apazona y nimesulida; antagonistas de leucotrieno, incluidos, pero no limitados a zileutona, aurotioglucosa, tiomalato sódico de oro y auranofina; esteroides, incluidos, pero no limitados a alclometasona dipropionato, amcinonida, beclometasona dipropionato, betametasona, betametasona benzoato, betametasona diproprionato, fosfato de betametasona sódica, betametasona valerato, clobetasol proprionato, clocortolona pivalato, hidrocortisona, derivados de hidrocortisona, desonida, desoximatasone, dexametasona, flunisolida, flucoxinolida, flurandrenolida, halcinocida, medrisona, metilprednisolona, metprednisolona acetato, succinato sódico de metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona acetato, prednisolona, prednisolona acetato, fosfato sódico de prednisolona, prednisolona tebuatato, prednisona, triamcinolona, triamcinolona acetónido, triamcinolona diacetato, y triamcinolona hexacetónido; y otros agentes anti-inflamatorios, incluidos pero no limitados a metotrexato, colchicin, allopurinol, probenecid, sulfinpirazona y benzbromarona.

[00131] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con otro agente anti-vírico. Agentes ant-víricos útiles incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa reversa de nucleósido, inhibidores de transcriptasa reversa de no nucleósido y análogos de nucleósido. Los agentes anti-víricos incluyen pero no se limitan a zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, levovirina, viramidina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones α, interferones β, interferones γ, adefovir, clevudina, entecavir, y pleconaril.

[00132] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente inmunomodulador. Agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, micofenolato mofetil, rapamicina (sirolimus), mizoribina, deoxispergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), modulares de receptor de linfocitos T, y moduladores de receptor de citocinas, miméticos de péptidos, y anticuerpos (por ejemplo, fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)2 o fragmentos de fijación a epítopo), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico complementario y triples hélices), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos, y compuestos inorgánicos. Ejemplos de moduladores de receptor de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de receptor de linfocitos anti-T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1® (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Orthoclone y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado enlazado a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales de ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-

131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2, anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114 (IDEC)) y CTLA4-inmunoglobulina. Ejemplos de moduladores de receptor de citocinas incluyen, pero no se limitan a, receptores de citocinas solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor TNF-α o su fragmento, el dominio extracelular de un receptor IL-1β o su fragmento, y el dominio extracelular de un receptor IL-6 o su fragmento), citocinas o sus fragmentos (por ejemplo, interleucina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF-α, interferón (IFN)-α, IFN-β, IFN-γ, y GM-CSF), anticuerpos de receptor anti-citocina (por ejemplo, anticuerpos de receptor anti-IFN, anticuerpos de receptor anti-IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos de receptor anti-IL-4, anticuerpos de receptor anti-IL-6, anticuerpos de receptor anti-IL-10, y anticuerpos de receptor anti-IL-12), anticuerpos anti-citocina (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti-TNF-α, anticuerpos anti-IL-β, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, ABX-IL-8 (Abgenix)), y anticuerpos anti-IL-12).

[00133] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente que inhiba enzimas víricas, incluidos, pero no limitados a inhibidores de proteasa HCV, tales como BILN 2061 e inhibidores de polimerasa NS5b tales como NM107 y su profármaco NM283 (Idenix Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA).

[00134] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente que inhiba la polimerasa HCV tales como los descritos en Wu, Curr Drug Targets Infect Disord. 2003;3(3):207-19, o en combinación con compuestos que inhiban la función helicasa del virus, tales como los descritos en Bretner M, et al Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2003;22(5-8):1531, o con inhibidores de otras dianas específicas de HCV, tales como los descritos en Zhang X. IDrugs, 2002;5(2):154-8.

[00135] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente que inhiba la replicación vírica.

[00136] Los ligandos TLR7 o profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con citocinas. Ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucina -2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), interleucina-18 (IL-18), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), eritropoietina (Epo), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), prolactina, e interferón (IFN), por ejemplo, IFN-α, e IFN-γ).

[00137] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con hormonas. Ejemplos de hormonas incluyen, pero no se limitan a, luliberina (LHRH), hormona del crecimiento (GH), somatoliberina, ACTH, somatostatina, somatotropina, somatomedina, paratirina, factores liberadores hipotalámicos, insulina, glucagón, encefalinas, vasopresina, calcitonina, heparina, heparinas de bajo peso molecular, heparinoides, opiodes naturales y sintéticos, tirotropinas de la insulina, y endorfinas.

[00138] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con *β*-interferones que incluyen, pero no se limitan a, interferón *β*-1a, interferón *β*-1b.

[00139] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con α-interferones que incluyen, pero no se limitan a, interferón α-1, interferón α-2a (roferon), interferón α-2b, intrón, Peg-Intron, Pegasys, interferón de consenso (infergen) y albuferón.

[00140] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un reforzador de absorción, particularmente aquellos que tienen como diana el sistema linfático, incluidos, pero no limitados a glicolato sódico; caprato sódico; N-lauril-γ-D-maltopiranósido; EDTA; micela mixta; y aquellos relacionados de Muranishi Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 7-1-33, que se incorpora aquí por referencia en su integridad. Pueden usarse asimismo otros reforzadores de absorción conocidos. Por lo tanto, la invención incluye asimismo una composición farmacéutica que comprende uno o más profármacos de ligando TLR7 de la invención y uno o más reforzadores de absorción.

[00141] Los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse o formularse en combinación con un agente alquilante. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, mostazas nitrogenadas, etileniminas, metilmelaminas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucil, hexametilmelaína, tiotepa, busulfán, carmustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida.

[00142] Los compuestos de la invención y los demás agentes terapéuticos pueden actuar en forma aditiva o, más preferiblemente, sinérgicamente. En una incorporación preferida, una composición que comprende un compuesto de la invención se administra concurrentemente con la administración de otro agente terapéutico, que puede ser parte de la misma composición o en una composición diferente de la que comprende los compuestos de la invención. En otra incorporación, un compuesto de la invención se administra antes o subsiguiente a la administración de otro agente terapéutico. En una incorporación separada, un compuesto de la invención se administra a un paciente que no se ha sometido previamente, o en la actualidad no está siendo sometido, a tratamiento con otro agente terapéutico, particularmente un agente antivírico.

[00143] En una incorporación, los métodos de la invención comprenden la administración de uno o más ligandos TLR7 ligands o profármacos de

ligando TLR7 de la invención sin un agente terapéutico adicional.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y PRESENTACIONES FARMACÉUTICAS

[00144] Composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias simples que comprenden un ligando TLR7 o profármaco de la invención, o su sal, hidrato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, están abarcadas también por la invención. Presentaciones farmacéuticas individual de la invención pueden ser apropiadas para administración oral, mucosal (incluidas la mucosa sublingual, oral, rectal, nasal, o vaginal), parenteral (incluida inyección subcutánea, intramuscular, inyección intravenosa rápida, intraarterial, o intravenosa), transdérmica, o tópica. En una incorporación específica los compuestos de la invención se administran por vía mucosal (incluidas la mucosa sublingual, oral, rectal, nasal, o vaginal), parenteral (incluida subcutánea, intramuscular, inyección intravenosa rápida, intraarterial, o intravenosa), transdérmica, o tópica. Típicamente, composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención comprenden además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se contemplan asimismo presentaciones farmacéuticas.

[00145] En una incorporación alternativa, una composición farmacéutica comprendida por esta incorporación incluye un ligando TLR7 o profármaco de la invención, o su sal, hidrato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, y por lo menos un agente terapéutico adicional. Ejemplos de agente terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en la sección 5.2.2.

[00146] La composición, forma, y tipo de las presentaciones farmacéuticas de la invención variarán típicamente dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma farmacéutica empleada en el tratamiento agudo de una enfermedad o una enfermedad relacionada puede contener cantidades mayores de uno o más de los ingredientes activos incluidos que una forma farmacéutica empleada en el tratamiento crónico de la misma enfermedad. Análogamente, una forma farmacéuticamente parenteral puede contener cantidades menores de uno o más de los ingredientes activos incluidos que

una forma farmacéutica oral empleada para tratar la misma enfermedad o trastorno.

[00147] Éstas y otras maneras en las cuales variarán unas de otras formas farmacéuticas específicas abarcadas por esta invención serán fácilmente evidentes a aquellas personas expertas en el arte. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990). Ejemplos de formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a: tabletas; comprimidos oblongos; cápsulas, tales como cápsulas elásticas de gelatina blandas; sellos; trociscos; pastillas para chupar; dispersiones; supositorios; ungüentos; cataplasmas (preparados tópicos); pastas; polvos; apósitos; cremas; emplastos; soluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, atomizadores nasales o inhaladores); geles; formas farmacéuticas líquidas apropiadas para administración oral o mucosal a un paciente, incluidas suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas no acuosas, emulsiones aceite-en-agua, o emulsiones líquidas agua-en-aceite), soluciones, y elíxires; formas farmacéuticas líquidas apropiadas para administración parenteral a un paciente; y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para ofrecer formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración parenteral a un paciente.

[00148] Composiciones farmacéuticas típicas y formas farmacéuticas comprenden uno o más vehículos, excipientes o diluyentes. Excipientes apropiados son bien conocidos por aquellas personas expertas en el arte farmacéutico, y aquí se suministran ejemplos no limitantes de excipientes adecuados. Si un excipiente particular es apropiado o no para incorporación en una composición farmacéutica o forma farmacéutica depende de una variedad de factores bien conocidos en el arte incluidos, pero no limitados a, la manera en que la forma farmacéutica se administrará a un paciente. Por ejemplo, formas farmacéuticas orales tales como tabletas pueden contener excipientes no aptos para uso en formas farmacéuticas parenterales. La idoneidad de un excipiente particular puede depender asimismo de los ingredientes activos específicos en la forma farmacéutica.

[00149] Esta invención abarca además composiciones farmacéuticas anhidras y formas farmacéuticas que comprenden ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) es ampliamente aceptada en las artes farmacéuticas como un medio de simular el almacenamiento a largo plazo, con el fin de determinar características tales como vida útil o la estabilidad de las formulaciones con el tiempo. Véase, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 2d. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, páginas 379-80. En efecto, el agua y el calor aceleran la descomposición de algunos compuestos. Por lo tanto, el efecto del agua sobre una formulación puede ser de gran importancia, puesto que el vapor de agua en la atmósfera y/o la humedad se encuentran por lo común durante la manufactura, manipulación, empaque, almacenamiento, despacho y uso de las formulaciones.

[00150] Composiciones farmacéuticas anhidras y formas farmacéuticas de la invención pueden prepararse utilizando ingredientes anhidros o que contengan poco volumen de vapor de agua y condiciones de poco volumen de vapor de agua o poco volumen de humedad .

[00151] Una composición farmacéutica anhidra debe prepararse y almacenarse de modo que se mantenga su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras preferiblemente se empacan utilizando materiales conocidos por impedir la exposición al agua, de manera que puedan incluirse en estuches de formulación adecuados. Ejemplos de empaque apropiado incluyen, pero no se limitan a, películas herméticamente selladas, plásticos, envases de dosis unitaria (por ejemplo, frasquitos), empaques tipo blíster, y empaques en forma de tiras.

[00152] La invención abarca además composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos que reducen la velocidad a la cual se descompondrá un ingrediente activo. Tales compuestos, denominados aquí "estabilizantes," incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, neutralizadores de pH, o neutralizadores de sal.

[00153] Al igual que las cantidades y tipos de excipientes, las cantidades y tipos específicos de ingredientes activos en una forma farmacéutica pueden diferir dependiendo de factores tales como, mas no limitados a, la vía por la cual ésta tiene que administrarse a los pacientes. No obstante, formas farmacéuticas típicas de la invención comprenden profármacos de ligando TLR7 de la invención, o su sal, hidrato o estereoisómeros comprenden 0.1 mg a 1.500 mg por unidad para proporcionar dosis de alrededor de 0.01 a 200 mg/kg al día.

Formas Farmacéuticas Orales

[00154] Composiciones farmacéuticas de la invención que son apropiadas para administración oral pueden presentarse como formas farmacéuticas discretas, tales como, aunque no limitadas a, tabletas (por ejemplo, tabletas masticables), comprimidos oblongos, cápsulas, y líquidos (por ejemplo, jarabes con sabor). Tales formas farmacéuticas contienen cantidades predeterminadas de ingredientes activos, y pueden prepararse por métodos de farmacia bien conocidos por aquellos con habilidades en el arte. Por lo general, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

[00155] Formas farmacéuticas orales típicas de la invención se preparan combinando el ingrediente activo(s) en estrecha mezcla con por lo menos un excipiente, de acuerdo con técnicas convencionales farmacéuticas de composición. Los excipientes pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la modalidad de preparación deseada para administración. Por ejemplo, excipientes apropiados para uso en formas farmacéuticas orales, líquidas o en aerosol, incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, preservantes, y colorantes. Ejemplos de excipientes apropiados para uso en formas farmacéuticas orales sólidas (por ejemplo, polvos, tabletas, cápsulas, y comprimidos oblongos) incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa micro-cristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, y agentes desagregantes.

[00156] Debido a su facilidad de administración, las tabletas y

cápsulas representan las formas farmacéuticas unitarias orales más ventajosas, caso en el cual se emplean excipientes sólidos. Si se desea, las tabletas pueden recubrirse con técnicas estándar acuosas o no acuosas. Tales formas farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas se preparan mezclando de manera uniforme y estrecha los ingredientes activos con portadores líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego dándole forma al producto en la presentación deseada, si es necesario.

[00157] Por ejemplo, una tableta puede prepararse por compresión o moldeo. Las tabletas comprimidas pueden prepararse compactando en una máquina apropiada los ingredientes activos en una forma que se deslice libremente (***"a free-flowing form"***) tal como polvo o gránulos, mezclados opcionalmente con un excipiente. Las tabletas moldeadas pueden elaborarse moldeando en una máquina apropiada una mezcla del compuesto en polvo humectado con un diluyente líquido inerte.

[00158] Ejemplos de excipientes que pueden usarse en formas farmacéuticas orales de la invención incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, rellenos, desagregantes, y lubricantes. Aglutinantes apropiados para empleo en composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de papa, u otros almidones, gelatina, gomas sintéticas y naturales tales como acacia, alginato sódico, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma de guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinil pirrolidona, metilcelulosa, almidón pre-gelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, (por ejemplo, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y sus mezclas.

[00159] Ejemplos de rellenos apropiados para uso en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas divulgadas aquí incluyen, pero no se limitan a, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, mannitol,

ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y sus mezclas. Típicamente, el aglutinante o el relleno en composiciones farmacéuticas de la invención está presente en desde alrededor de 50 a alrededor de 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma farmacéuticas.

[00160] Formas apropiadas de celulosa microcristalina incluyen, pero no se limitan a, los materiales comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponible de FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), y sus mezclas. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica comercializada como AVICEL RC-581. Excipientes o aditivos anhidros o con bajo volumen de humedad incluyen AVICEL-PH-103™ y Starch 1500 LM.

[00161] Los desagregantes se utilizan en las composiciones de la invención para proporcionar tabletas que se desintegren al exponerlas a un ambiente acuoso. Las tabletas que contienen demasiado desagregante se pueden desintegrar durante el almacenamiento, mientras que aquellas que contienen demasiado poco pueden no desintegrarse a una velocidad deseada o bajo las condiciones deseadas. Por consiguiente, para formar formas farmacéuticas orales de la invención debe emplearse una cantidad suficiente de desagregante que no sea demasiado alta ni demasiado baja para alterar de manera perjudicial la liberación de los ingredientes activos. La cantidad de desagregante utilizado varía con base en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible por aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte. Las composiciones farmacéuticas típicas comprenden desde alrededor de 0.5 a alrededor de 15 por ciento en peso de desagregante, específicamente desde alrededor de 1 a alrededor de 5 por ciento en peso de desagregante.

[00162] Los desagregantes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, agar-agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato sódico de almidón, almidón de papa o yuca, almidón pre-

gelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y sus mezclas.

[00163] Lubricantes que pueden empelarse en composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral liviano, glicerina, sorbitol, mannitol, polietilen glicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soya), estearato de zinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar, y sus mezclas. Lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (***"syloid silica gel"***) (AEROSIL 200, manufacturado por W.R. Grace Co. of Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializada por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicona pirógena vendido por Cabot Co. de Boston, MA), y sus mezclas. Si se usan, los lubricantes se emplean típicamente en una cantidad de menos de alrededor de 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas en las cuales se incorporan.

Formas Farmacéuticas de Liberación Retardada

[00164] Ingredientes activos de la invención pueden administrarse por medios de liberación controlada o mediante dispositivos de aplicación que son bien conocidos por aquellas personas de habilidad ordinaria en arte. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos No.: 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; y 4,008,719, 5,674,533, 5,059,595, 5,591,767, 5,120,548, 5,073,543, 5,639,476, 5,354,556, y 5,733,566, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia. Tales formas farmacéuticas pueden emplearse para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multi-capa, micropartículas, liposomas, miniesferas, o una

combinación de los mismos para ofrecer el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Formulaciones apropiadas de liberación controlada, conocidas por aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte, incluidas las descritas aquí, pueden seleccionarse fácilmente para uso con los ingredientes activos de la invención. Por lo tanto, la invención abarca formas farmacéuticas unitarias simples, apropiadas para administración oral tales como, pero no limitadas a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gelatina, y comprimidos oblongos que se adaptan para liberación controlada.

[00165] Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen un objetivo común de mejorar la terapia medicinal sobre el logrado por sus contrapartes de liberación no controlada. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada, óptimamente diseñada, en tratamiento médico se caracteriza por emplear un mínimo de sustancia para curar o controlar la enfermedad en una cantidad mínima de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen una actividad extendida del medicamento, frecuencia posológica reducida, y creciente observancia de las instrucciones médicas por parte del paciente. Además, las formulaciones de liberación controlada pueden utilizarse para afectar el tiempo de iniciación de la acción u otras características, tales como niveles sanguíneos del medicamento, y pueden, por consiguiente, afectar la ocurrencia de efectos colaterales (por ejemplo, adversos).

[00166] La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de medicamento (ingrediente activo) que produzca prontamente el efecto terapéutico deseado, y gradual y continuamente libere otras cantidades de medicamento para mantener este nivel de efecto profiláctico o terapéutico durante un período extendido de tiempo. Con el fin de mantener este nivel constante de medicamento en el cuerpo, el medicamento tiene que liberarse de la forma farmacéutica a una velocidad que reemplace la cantidad del medicamento que se está metabolizando y excretado del cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo puede estimularse mediante varias condiciones incluidas, pero no limitadas a, pH, temperatura, enzimas, agua, o u otras condiciones

fisiológicas o compuestos.

Formulaciones Farmacéuticas Parenterales

[00167] Formulaciones farmacéuticas parenterales pueden administrarse a pacientes por varias rutas incluidas, pero no limitadas a, subcutánea, intravenosa (incluida inyección intravenosa rápida), intramuscular, e intraarterial. Debido a que, típicamente, su administración elude las defensas naturales del paciente contra contaminantes, las formulaciones farmacéuticas parenterales son preferiblemente estériles o susceptibles de esterilizarse antes de la administración a un paciente. Ejemplos de formulaciones farmacéuticas parenterales incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos liofilizados y/o secos listos para disolverse o suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección (polvos reconstituibles), suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

[00168] Vehículos apropiados que pueden usarse para suministrar formulaciones farmacéuticas parenterales de la invención son bien conocidos por aquellas personas expertas en el arte. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: Agua para Inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Cloruro de Sodio y Dextrosa, e Inyección de Ringer Lactada; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilen glicol, y polipropilen glicol; y vehículos no acuosos, tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de ajonjolí, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.

[00169] Compuestos que incrementan la solubilidad de uno o más de los ingredientes activos divulgados aquí pueden incorporarse asimismo en las formas farmacéuticas parenterales de la invención.

Formas Farmacéuticas Transdérmicas

[00170] Las formas farmacéuticas transdérmicas incluyen parches "tipo depósito" o "tipo matriz", que pueden aplicarse a la piel y llevarse durante un período específico de tiempo para permitir la penetración de una

cantidad deseada de ingredientes activos.

[00171] Excipientes apropiados (por ejemplo, vehículos y diluyentes) y otros materiales que pueden usarse para suministrar formas farmacéuticas típicas y transdérmicas, abarcadas por esta invención, son bien conocidas por aquellos con habilidad en las artes farmacéuticas, y dependen del tejido particular al cual se aplicará una composición farmacéutica dada o forma farmacéutica. Con ese hecho en mente, excipientes típicos incluyen, pero no se limitan a, agua, acetona, etanol, etilen glicol, propilen glicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y sus mezclas.

[00172] Dependiendo del tejido específico por tratar, componentes adicionales pueden empelarse antes de, en conjunción con, o subsiguiente al tratamiento con ingredientes activos de la invención. Por ejemplo, reforzadores de penetración pueden utilizarse para ayudar en la aplicación de los ingredientes activos al tejido. Reforzadores de penetración apropiados incluyen, pero no se limitan a: acetona; varios alcoholes tales como etanol, oleilo, y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo tales como sulfóxido de dimetilo; acetamida de dimetilo; formamida de dimetilo; polietilen glicol; pirrolidonas tales como polivinilpirrolidona; grados de Kollidon (Povidona, Polividona); urea; y diferentes ésteres de azúcares solubles o insolubles en agua tales como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitana).

[00173] El pH de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, o del tejido al cual se aplica la composición farmacéutica o forma farmacéutica, puede ajustarse igualmente para mejorar la liberación de uno o más ingredientes activos. Análogamente, la polaridad de un vehículo disolvente, su concentración iónica, o tonicidad puede ajustarse para mejorar la entrega. Compuestos tales como estearatos pueden agregarse también a las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas para alterar ventajosamente la hidrofilidad o lipofilidado de uno o más ingredientes activos, con el fin de incrementar la entrega. En este aspecto, los estearatos pueden servir como un vehículo de lípidos para la

formulación, como agente emulsificante o surfactante, y como agente promotores de la entrega o reforzadores de la penetración. Diferentes sales, hidratos o solvatos de los ingredientes activos pueden usarse para ajustar aún más las propiedades de la composición resultante.

Formas Farmacéuticas Tópicas

[00174] Formas farmacéuticas tópicas de la invención incluyen, pero no se limitan a, cremas, lociones, ungüentos, geles, soluciones, emulsiones, suspensiones, u otras formas conocidas por una persona de habilidad en el arte. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1985).

[00175] Excipientes apropiados (por ejemplo, vehículos y diluyentes) y otros materiales que pueden utilizarse para suministrar formas farmacéuticas tópicas y transdérmicas abarcadas por esta invención son bien conocidas por aquellas personas con habilidad en las artes farmacéuticas, y dependen del tejido particular al cual se aplicará una composición farmacéutica o forma farmacéutica. Con ese hecho en mente, excipientes típicos incluyen, pero no se limitan a, agua, acetona, etanol, etilen glicol, propilen glicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y sus mezclas.

[00176] Dependiendo del tejido específico por tratar, componentes adicionales pueden emplearse antes de, en conjunción con, o subsiguiente al tratamiento con ingredientes activos de la invención. Por ejemplo, reforzadores de penetración pueden usarse para ayudar en entregar los ingredientes activos al tejido. Reforzadores de penetración apropiados incluyen, pero no se limitan a: acetona; varios alcoholes tales como etanol, oleilo, y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo tales como sulfóxido de dimetilo; acetamida de dimetilo; formamida de dimetilo; poletilen glicol; pirrolidonas tales como polivinilpirrolidona; grados de Kollidon (Povidona, Polividona); urea; y diferentes ésteres de azúcares solubles o insolubles en agua tales como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monostearato de sorbitana).

Formas Farmacéuticas Mucosales

[00177] Formas farmacéuticas mucosales de la invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones oftálmicas, atomezadores y aerosoles, u otras formas conocidas por una persona de habilidad en el arte. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1985). Formas farmacéuticas apropiadas para tratar tejidos mucosales en la cavidad oral pueden formularse como enjuagues bucales o como geles orales. En una incorporación, el aerosol comprende un vehículo. En otra incorporación, el aerosol está libre de vehículo.

[00178] En igual forma, los ligandos TLR7 o los profármacos de ligando TLR7 de la invención pueden administrarse directamente al pulmón mediante inhalación. Para administración por inhalación, un ligando TLR7 puede entregarse convenientemente al pulmón mediante un número de diferentes dispositivos. Por ejemplo, un Inhalador de Dosis Medida ("MDI") que utiliza latas que contienen un gas propelente adecuado de bajo punto de ebullición, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado puede utilizarse para entregar un ligando TLR7 directamente al pulmón. Dispositivos MDI se encuentran disponibles de un gran número de proveedores tales como 3M Corporation, Aventis, Boehringer Ingelheim, Forest Laboratories, Glaxo-Wellcome, Schering Plough y Vectura.

[00179] Alternativamente, un dispositivo Inhalador de Polvo Seco (DPI) puede usarse para administrar un ligando TLR7 al pulmón (véase, por ejemplo, Raleigh *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Research Annual Meeting, 1999, 40, 397, que se incorpora aquí por referencia). Típicamente los dispositivos DPI utilizan un mecanismo tal como una explosión de gas para crear una nube de polvo seco en el interior de un envase, la cual puede ser inhalada luego por el paciente. Los dispositivos DPI son igualmente bien conocidos en el arte y pueden adquirirse de un número de proveedores que incluyen, por ejemplo, Fisons, Glaxo-Wellcome, Inhale Therapeutic

Systems, ML Laboratories, Qdose y Vectura. Una variación popular es el sistema DPI de dosis múltiple ("MDDPI"), que permite la entrega de más de una dosis terapéutica. Los dispositivos MDDPI se encuentran disponibles de compañías tales como AstraZeneca, Glaxo Wellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma y Vectura. Por ejemplo, pueden formularse cápsulas y cartuchos de gelatina para empleo en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón para estos sistemas.

[00180] Otro tipo de dispositivo que puede utilizarse para entregar un ligando TLR7 o profármaco de ligando TLR7 al pulmón es un dispositivo atomizador de líquido suministrado, por ejemplo, por Aradigm Corporation. Los sistemas atomizadores de líquidos usan orificios de toberas pequeñas para aerosolizar formulaciones de medicamentos líquidos que pueden inhalarse directamente al pulmón.

[00181] En una incorporación preferida, un dispositivo nebulizador se emplea para entregar ligandos TLR7 o profármacos de ligando de TLR al pulmón. Los nebulizadores crean aerosoles de formulaciones de medicamentos líquidos usando, por ejemplo, energía ultrasónica para formar partículas finas que pueden inhalarse fácilmente (Véase, por ejemplo, Verschoyle *et al.*, British J. Cancer, 1999, 80, Suppl 2, 96, que se incorpora aquí por referencia). Ejemplos de nebulizadores incluyen dispositivos suministrados por Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd, Aventis, y Batelle Pulmonary Therapeutics. Véase las Patentes de los Estados Unidos No. 5,954,047; 5,950,619; 5,970,974, las cuales se incorporan aquí por referencia.

[00182] En una incorporación particularmente preferida, un dispositivo aerosol electrohidrodinámico ("EHD") se usa para llevar los ligandos TLR7 y los profármacos de ligando TLR7 al pulmón. Los dispositivos aerosoles EHD utilizan energía eléctrica para atomizar soluciones de medicamento líquidas o suspensiones (véase, por ejemplo, Noakes *et al.*, Patente de los Estados Unidos No. 4,765,539; Coffee, Patente de los Estados Unidos No., 4,962,885; Coffee, Solicitud PCT, WO 94/12285; Coffee, Solicitud PCT,

WO 94/14543; Coffee, Solicitud PCT, WO 95/26234, Coffee, Solicitud PCT, WO 95/26235, Coffee, Solicitud PCT, WO 95/32807, las cuales se incorporan aquí por referencia). Las propiedades electroquímicas de la formulación de ligando TLR7 y profármacos de ligando TLR7 pueden ser parámetros importantes a optimizar, cuando se lleva este medicamento al pulmón con un dispositivo aerosol EHD, y tal optimización se lleva a cabo en forma rutinaria por una persona de habilidad en el arte. Los dispositivos aerosoles EHD pueden aplicar medicamentos más eficientemente al pulmón que las tecnologías de aplicación pulmonar existentes. Otros métodos de aplicación intra-pulmonar de ligando TLR7 y profármacos de ligando TLR7 serán conocidos por el artesano experto y se encuentran dentro del ámbito de la invención.

[00183] Formulaciones líquidas de medicamento apropiadas para uso con nebulizadores y dispositivos atomizadores de líquidos y dispositivos aerosoles EHD incluirán por lo general un ligando TLR7 o profármaco de ligando TLR7 con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido tal como alcohol, agua, polietilen glicol o un perfluorocarbonado. Opcionalmente, puede agregarse otro material para alterar las propiedades del aerosol de la solución o suspensión del ligando TLR7 o profármaco de un ligando TLR7. Preferiblemente, este material es un líquido tal como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Otros métodos de formular soluciones de medicamento líquidas o suspensión apropiada para uso en dispositivos aerosoles son conocidos por las personas de habilidad en el arte (véase, por ejemplo, Biesalski, Patentes de los Estados Unidos. No. 5,112,598; Biesalski, 5,556,611, las cuales se incorporan aquí por referencia) Un ligando TLR7 o profármaco de un ligando TLR7 pueden formularse además en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención que contengan, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[00184] Aparte de las formulaciones descritas previamente, un ligando TLR7 o profármaco de ligando TLR7 pueden formularse igualmente como

una preparación de absorción (***"a depot preparation"***). Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. En consecuencia, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales hidrófobos o poliméricos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

[00185] Alternativamente, pueden empelarse otros sistemas de administración farmacéutica. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que pueden emplearse para dispensar ligandos TLR7 y profármacos de ligando TLR7. Asimismo pueden utilizarse ciertos disolventes orgánicos tales como sulfóxido de dimetilo, aunque habitualmente al costo de una mayor toxicidad. Un ligando TLR7 o profármaco de un ligando TLR7 puede aplicarse también en un sistema de liberación controlada. En una incorporación, puede usarse una bomba (Sefton, CRC Crit. Ref Biomed Eng., 1987, 14, 201; Buchwald *et al.*, Surgery, 1980, 88, 507; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med., 1989, 321, 574). En otra incorporación, pueden emplearse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 1983, 23, 61; véase también Levy *et al.*, Science, 1985, 228, 190; During *et al.*, Ann. Neurol., 1989,25,351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71, 105). En todavía otra incorporación, un sistema de liberación controlada puede situarse en proximidad de la diana de los compuestos de la invención, por ejemplo, el pulmón, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 (1984)). Puede utilizarse otro sistema de liberación controlada (véase, por ejemplo Langer, Science, 1990, 249, 1527).

[00186] Excipientes apropiados (por ejemplo, vehículos y diluyentes) y otros materiales que pueden emplearse para proporcionar formas farmacéuticas mucosales, abarcadas por esta invención, son bien conocidas por las personas de habilidad en las artes farmacéuticas, y dependen del sitio particular o método en que se administrará una composición farmacéutica o forma farmacéutica dada. Con este hecho en mente, excipientes típicos incluyen, pero no se limitan a, agua, etanol, etilen glicol, propilen glicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y sus mezclas, que son atóxicos y farmacéuticamente aceptables. Ejemplos tales ingredientes adicionales son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990).

[00187] El pH de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, o del tejido al cual se aplica la composición farmacéutica o forma farmacéutica, puede ajustarse también para mejorar la administración de uno o más ingredientes activos. Análogamente, la polaridad de un vehículo disolvente, su concentración iónica, o tonicidad pueden ajustarse para mejorar la entrega. De igual manera pueden agregarse compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas para alterar ventajosamente la hidrofilidad o la lipofilidad de uno o más ingredientes activos, con el fin de mejorar la administración. En este aspecto, los estearatos pueden servir como vehículo de lípidos para la formulación, como un agente emulsionante o surfactante, y como un agente reforzador de la entrega o la penetración. Pueden usarse diferentes sales, hidratos o solvatos de los ingredientes activos para ajustar aún más las propiedades de la composición resultante.

ESTUCHES

[00188] La invención contempla un empaque farmacéutico o estuche conformado por uno o más envases que comprenden un profármaco de ligando TLR7 útil para el tratamiento o prevención de una infección por el virus de hepatitis C. En otras incorporaciones, la invención provee un empaque farmacéutico o estuche que comprende uno o más envases que

incluyen un profármaco de ligando TLR7, útil para el tratamiento o prevención de una infección por el virus de hepatitis C, y uno o más envases que comprenden un agente terapéutico adicional, incluidos, pero no limitados a, los enumerados en la sección 5.2.2 anterior, en particular un agente antiviral, un interferón, un agente que inhibe las enzimas víricas, o un agente que inhibe la replicación vírica, preferiblemente el agente terapéutico adicional es específico de HCV o demuestra actividad anti-HCV.

[00189] La invención provee asimismo un empaque farmacéutico o estuche que comprende uno o más envases que incluyen uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociada opcionalmente con tal envase (s) puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la manufactura, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleje la aprobación de la manufactura, uso o venta para administración humana por parte de la agencia.

ANÁLISIS

[00190] Los ligandos TLR7, profármacos de ligando TLR7, composiciones y formas farmacéuticas de la invención pueden valorarse *in vitro* o *in vivo* por una variedad de métodos conocidos en el arte para probar la actividad. Véase, por ejemplo, los métodos discutidos más adelante y empelados a todo lo largo de los ejemplos.

[00191] Una gama de análisis para el propósito de evaluar la actividad de TLR7 se encuentran disponibles, y se describen en las siguientes publicaciones, cada una de las cuales se incorpora por referencia: Hirota *et al., J. Med. Chem.*, 45, 5419-5422 (2002); y Akira S. *et al., Immunology Letters,* 85, 85-95 (2003). Por ejemplo, un sistema útil para la valoración de ligandos TLR7, en el cual el gen de TLR7 se clona por métodos conocidos por las personas de habilidad en el arte y se transfecta en un tipo de célula apropiado de modo que el TLR7 se exprese y se acople a un plásmido indicador de NFkB-luciferasa. En este sistema celular, la exposición a los profármacos de ligando TLR7 en cultivo de células resulta

en una señal de luminiscencia cuantificable. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Proc. Nat. Acad. USA*, 100, 6646-6651 (2003); Hemmi *et al*, *Nat. Immunol*, 3, 196-200 (2002); y Jurk *et al.*, *Nat. Immunol*, 3, 499 (2002) (en donde las referencias a Lee *et al.*, Hemmi *et al.*, y Jurk *et al.*, se incorporan aquí por referencia).

[00192] Otro ejemplo de un método *in vitro* es exponer células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) al profármaco candidato de ligando TLR7 durante un intervalo predeterminado (por ejemplo, 2 horas a 24 horas), seguido por la medición de la actividad inmunitaria. Tal actividad inmunitaria puede incluir inducción de la síntesis de citocinas, la cual puede medirse en el sobrenadante del cultivo mediante el análisis ELISA de la proteína citocina, tal como interferón Tipo 1 (interferón α, interferón β) o interferón Tipo 2 (interferón γ). Alternativamente, las PBMC pueden cosecharse luego de la incubación con el profármaco candidato de ligando TLR7, extraerse el ARN PBMC, y determinarse el nivel de inducción de genes del sistema inmunitario mediante análisis de protección a ARNsa del ARN extraido. Los genes típicamente inducidos incluyen 2'5'-OAS, o interferón γ, pero puede medirse un margen de citocinas. Véase, por ejemplo, Hirota *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5419-5422 (2002).

[00193] Análisis de protección de RNAsa (RPA) son un método conocido en el arte, en donde analitos de ARN se cuantifican hibridándolos primero a una secuencia de ARN radiomarcada, específica del analito de ARN, seguida por la digestión con enzimas que selectivamente degradan ARN de hebra única. La muestra se somete entonces a electroforesis en gel bajo condiciones que resuelven el ARN de doble hebra protegido e hibridado. A continuación se autorradiografía el gel para revelar la ubicación e intensidad de las bandas. Éstas pueden cuantificarse por métodos bien conocidos en el arte. Pueden analizarse simultáneamente múltiples especies de analitos de ARN, si los fragmentos protegidos son suficientemente diferentes en tamaño para permitir su separación mediante electroforesis en gel. La comparación de los niveles de un analito de ARN

con una especie de ARN de control, que se expresa a niveles constantes en las células, proporciona un control interno que permite monitorear cambios en los niveles de la especie de analito de ARN, incluso si varía la cantidad total del ARN. Tales análisis de protección de RNAsa pueden realizarse en la siguiente forma:

[00194] Se purifica ARN de miniesferas de PMBC usando el estuche "RNAeasy" (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Juegos de plantillas pueden obtenerse de PharMingen (BD Biosciences); un juego útil, disponible comercialmente del proveedor, contiene materiales que permiten el análisis de TNF-α, IL12 p35, IP10, IL-1a, IL-1b, IL-6, Interferón γ, y la especie de ARN de control L32 y GAPDH. Este juego de plantillas contiene ADN apropiado para a síntesis de la sonda adecuada de ARN para cada uno de los genes enumerados.

[00195] La síntesis de sondas se lleva a cabo usando el estuche de transcripción *in vitro* PharMingen. La reacción contiene un inhibidor de RNAsa; tampón de transcripción; 50 ng del juego de plantillas; 0.1375 mM de cada uno de rGTP, rCTP, rATP; 0.003 mM rUTP; 10 mM DTT, 0.010 mCi de [alpha 32P] UTP, y 20 Unidades de T7 ARN polimerasa en un volumen de 20 microlitros. La mezcla de reacción se incuba durante una hora a 37 °C, y luego se suspendió con la adición de 2 unidades de DNAsa libre de RNAsa, con una incubación adicional de 30 minutos a 37 °C. Las sondas de ARN sintetizadas en esta incubación se extraen una vez con 5.2 mM EDTA, 25 μl de fenol Tris Saturado, 25 μL de cloroformo, y 4 μg de tRNA de levadura, y luego se extrajeron con 50 μL de cloroformo. El ARN se precipita por la adición de 50 μL de 4M acetato de amonio y 250 μL de etanol 100% helado y, después de la incubación a -80 °C durante 30 minutos, la preparación se centrifuga a alta velocidad durante 30 minutos. La miniesfera se lava en etanol 100 % y, luego del retiro del etanol, la prueba se vuelve a suspender y se usa en la incubación de protección de RNAsa.

[00196] El análisis de protección de RNAsa usa el material de la sonda preparada anteriormente y se extrae el ARN de PBMC. El ARN PBMC se

lava en etanol 100%, se cuantifica por absorción a 260 nm. El RPA se lleva a cabo como se describe en el protocolo provisto en el estuche PharMingen RiboQuant kit. Ocho μL de las muestras de ARN PBMC se mezclan con los 2 μL de la sonda puesta en un tubo PCR de pared delgada, se mezclan bien, se centrifugan brevemente y luego se superponen con aceite mineral. En seguida el tubo se pone en un bloque de PCR a 90 °C, se enfría a 56 °C, y se incuba durante 16 horas. A continuación las muestras se enfrían a 37 °C y se agregan RNAsa A y RNAsa T1. La mezcla se incuba durante 45 minutos a 30 °C, y la reacción se suspende con una mezcla de proteasa K y tARN de levadura. El ARN se extrae con fenol-cloroformo, y luego se precipita del fenol-cloroformo con acetato de amonio-etanol. La miniesfera se lava con etanol y se vuelve a suspender en tampón por electroforesis. Las muestras se analizan por electroforesis en gel mediante métodos bien conocidos en la biología molecular.

[00197] Puede emplearse un número de análisis de acuerdo con la presente invención, con el fin de determinar el grado de actividad anti-vírica de un compuesto de la invención, tal como un cultivo de células, modelos animales, y administración a sujetos humanos. Los análisis descritos aquí pueden usarse para valorar el crecimiento vírico con el tiempo para determinar las características de crecimiento de un virus en la presencia de un compuesto de la invención.

[00198] En otra incorporación, un virus y un compuesto de la invención se administran a sujetos animales susceptibles a infección con el virus. La incidencia, gravedad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., pueden compararse con la incidencia, severidad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., observadas cuando a los sujetos se administra el virus solo (en la ausencia de un compuesto de la invención). La actividad anti-virus del compuesto de la invención se demuestra por una disminución en la incidencia, gravedad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., en la presencia del compuesto de la invención. En una incorporación específica, el virus y el compuesto de la invención se administran al sujeto animal al mismo tiempo.

En otra incorporación específica, el virus se administra al sujeto animal antes del compuesto de la invención. En otra incorporación específica, el compuesto de la invención se administra al sujeto animal antes del virus.

[00199] En otra incorporación, la tasa de crecimiento del virus puede analizarse tomando muestras de fluidos biológicos/muestras clínicas (por ejemplo, aspirado nasal, exudado faríngeo, esputo, lavado bronco-alveolar, orina, saliva, sangre, o suero) de sujetos humanos o animales en múltiples puntos de tiempo pos-infección en la presencia o ausencia de un compuesto de la invención y midiendo los niveles de virus. En incorporaciones específicas, la tasa de crecimiento de un virus se analiza valorando la presencia de virus en una muestra luego del crecimiento en un cultivo de células, crecimiento en un medio de cultivo permisible, o crecimiento en un sujeto usando cualquier método bien conocido en el arte, por ejemplo, pero no limitado a, inmunoanálisis (*por ejemplo,* ELISA; para una discusión con respecto a los ELISAs *véase, por ejemplo,* Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1), tinción inmunofluorescente, o análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo que reconoce inmunoespecíficamente el virus a analizarse, o detección de un ácido nucleico específico del virus (*por ejemplo*, por método de Southern o análisis RT-PCR, etc.).

[00200] En una incorporación específica, valoraciones víricas pueden determinarse obteniendo muestras de fluidos biológicos / muestras clínicas de células infectadas o un sujeto infectado, preparando una dilución en serie de la muestra e infectando una monocapa de células que son susceptibles de infección con el virus (por ejemplo, células primarias, estirpes celulares transformadas, muestras de tejido de pacientes, etc) en una dilución del virus que permite la emergencia de placas únicas. Las placas pueden contarse entonces y expresarse la valoración vírica expresada como unidades formadoras de placas por mililitro de muestra.

[00201] En una incorporación específica, la tasa de crecimiento de un virus en un sujeto puede calcularse mediante la valoración de la disolución

de anticuerpos contra el virus en el sujeto. La valoración sérica del anticuerpo puede determinarse por cualquier método bien conocido en el arte, por ejemplo, pero no limitado a, la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo en muestras de suero puede cuantificarse, por ejemplo, mediante ELISA.

[00202] Adicionalmente, la actividad *in vivo* de un ligando TLR7 o profármaco de un ligando TLR7 puede determinarse administrando directamente el compuesto a un animal de prueba, recolectando fluidos biológicos (por ejemplo, aspirado nasal, exudado faríngeo, esputo, lavado bronco-alveolar, orina, saliva, sangre, o suero) y examinando el fluido con respecto a la actividad anti-vírica.

[00203] En incorporaciones donde las muestras a analizarse para detectar niveles de virus son fluidos biológicos/muestras clínicas (por ejemplo, aspirado nasal, exudado faríngeo, esputo, lavado bronco-alveolar, orina, saliva, sangre, o suero), las muestras pueden contener o no contener células intactas. Muestras de sujetos que contienen células intactas pueden procesarse directamente, mientras que los aislados sin células intactas pueden cultivarse o no primeramente en una estirpe celular permitida (por ejemplo, células primarias, estirpes celulares transformadas, muestras de tejido de pacientes, etc.) o medio de cultivo (por ejemplo, caldo LB/agar, caldo YT/agar, agar sanguíneo, etc.). Las suspensiones celulares pueden aclararse por centrifugación a, por ejemplo, 300xg durante 5 minutos a temperatura de la sala, seguidas por un PBS, lavado pH 7.4 (libre de Ca++ y Mg++) bajo las mismas condiciones. Las miniesferas de células pueden re-suspenderse en un pequeño volumen de PBS para análisis. Aislados clínicos primarios que contienen células intactas pueden mezclarse con PBS y centrifugarse a 300xg durante 5 minutos a temperatura de la sala. Se elimina el moco de la interface con la punta de una pipeta estéril y las miniesferas pueden lavarse una vez más con PBS bajo las mismas condiciones. A continuación, las miniesferas pueden re-suspenderse en un pequeño volumen de PBS para análisis.

[00204] En otra incorporación, un compuesto de la invención se

administra a un sujeto humano infectado con un virus. La incidencia, gravedad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., pueden compararse con la incidencia, severidad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., observados en sujetos humanos infectados con un virus en la ausencia de un compuesto de la invención o en la presencia de un placebo. La actividad anti-vírica del compuesto de la invención se demuestra por una disminución en la incidencia, gravedad, duración, carga vírica, índice de mortalidad de la infección, etc., en la presencia del compuesto de la invención. Cualquier método conocido en el arte puede usarse para determinar la actividad anti-vírica en un sujeto, tales como los descritos previamente.

[00205] Adicionalmente, la actividad *in vivo* de un ligando TLR7 o profármaco de ligando TLR7 puede determinarse administrando directamente el compuesto a un sujeto humano o animal, recolectando muestras de fluidos biológicos/muestras clínicas (por ejemplo, aspirado nasal, exudado faríngeo, esputo, lavado bronco-alveolar, orina, saliva, sangre, o suero) y analizando los fluidos biológicos/muestras clínicas en cuanto a la actividad anti-vírica (por ejemplo, por adición a células en cultivo en la presencia del virus).

[00206] Lo anterior ha demostrados las características importantes y pertinentes de la presente invención. Una persona de habilidad en el arte observará que pueden diseñarse numerosas modificaciones e incorporaciones. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones anexas cubren la totalidad de tales modificaciones e incorporaciones.

6. EJEMPLOS

[00207] Los siguientes ejemplos son para efectos de ilustración únicamente y no tienen como finalidad limitar el ámbito de la invención.

6.1 Identificación del Ligando TLR7

[00208] Existen tres clases químicas conocidas de ligandos TLR7: guanosinas, imidazoquinolinas, y pirimidinas (véase Sección5.2). Como se describe más arriba, ligandos TLR7 adicionales se identifican fácilmente

por métodos conocidos de cribado. Por ejemplo, análogos de adenina y derivados se identificaron como ligandos TLR usando el siguiente procedimiento de cribado. Véase Tablas 1 y 2.

Una estirpe celular HEK293-hTLR7 estable se obtuvo de Invivogen (San Diego, California), se transfectó con pNiFty2-Luc, un plásmido de indicador de luciferasa inducible NF-kB (Invivogen) y se seleccionaron transfectantes estables (duales). Las estirpes celulares (hTLR7/pNiFty2-Luc) duales resultantes se examinaron funcionalmente mediante respuesta a loxoribina e isatoribina, medidas por inducción múltiple de luciferasa (***"fold luciferase induction"***) en relación con un control sin medicamento. La línea C23 se seleccionó debido a su respuesta satisfactoria y al perfil de sensibilidad con estos (y otros) agonistas TLR7. El fundamento biológico que conecta el enlazamiento TLR7 (***"TLR7 engagement"***) y la activación de NF-kB ha encontrado una aceptación de amplia difusión (para una reseña, véase Akira S. *et al., Immunol. Lett.,* 85, 85-95 (2003)) y, como consecuencia, el sistema indicador inducible HEK293-TLR-NF-kB se acepta como un análisis estándar que se ha usado consistentemente para valorar agonistas TLR(7), en formato de sistema estable o transitorio. Véase, por ejemplo, Hemmi H. *et al., Nat. Immunol.,* 3, 196-200 (2002); Jurk M. *et al., Nat. Immunol,* 3, 499 (2002); and Lee J. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 100, 6646-51 (2003).

[00209] Para un análisis C23 típico, las células se siembran en una concentración de $6x10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos y 4-24 horas después se tratan con diferentes concentraciones de compuesto. Después de 2-48 horas de exposición las monocapas de células se someten a lisis con tampón de lisis pasiva (Promega), y el análisis de luciferasa de luciérnaga se lleva a cabo usando el reactivo de análisis de luciferasa (Promega), según especificaciones del fabricante. Las actividades relativas de luciferasa se expresan como múltiplos de la inducción, comparadas con el control sin medicamentos. Una inducción doble sobre el arte previo se considera un agonista TLR7 *bona fide*, dependiendo de si esto es un incremento estadísticamente significativo.

Tabla 1: Isatoribina Activa TLR7 Humano en el Análisis HEK293

Compuesto No.	Concentración de compuesto, μM			
	50	100	250	500
21	3.1 (± 0.2)	3.4 (±0.1)	6.2 (± 0.5)	10.9 (± 0.7)

Tabla 2: El Derivado de Adenina Activa el TLR7 Humano en el Análisis HEK293

Compuesto No.	Concentración del compuesto, μM			
	1.0	3.2	10	32
29	20.8 (± 1.1)	37.3 (±0.5)	47.5 (±0.2)	48.4 (±0.4)

[00210] En Tabla 1, isatoribina se agregó a células C23 durante cuarenta y ocho horas y, a continuación, las células se cosecharon y valoraron en cuanto a la actividad luciferasa. Cada punto de tiempo se analizó en triplicado. Los datos presentados son la inducción múltiple media, comparados con el control sin medicamento, junto con la desviación estándar entre paréntesis.

[00211] En Tabla 2, un derivado de adenin **29** se agregó a células C23 durante veinticuatro horas y, en seguida, las células se cosecharon y valoraron en cuanto a la actividad luciferasa. Cada punto de tiempo se analizó en triplicado. Los datos presentados son la inducción múltiple media, comparados con el control sin medicamento, junto con la desviación estándar entre paréntesis.

6.2 Ligandos TLR7 Probados como Agentes anti-HCV

Reducción de la Carga Vírica HCV

[00212] El producto medicamento investigativo isatoribina se suministró como una solución 1 mg/mL en solución salina normal estéril contenida en una ampolleta de 50 mL. La isatoribina se administró en humanos por infusión intravenosa una vez al día durante 7 días, con 200, 400, 600 ó 800 mg por dosis. Todas las dosis se administraron por infusión de velocidad constante durante un período de 60 minutos, excepto que la dosis de 800 mg se administró durante un período de 80 minutos. El caudal de cada dosis fue el siguiente: 3.33 mL/min para la dosis de 200 mg; 6.67 mL/min para la dosis de 400 mg; 8.33 mL/min para la dosis de 500 mg; o 10.0 mL/min para la dosis de 600 mg y 800 mg.

[00213] Cuatro a doce pacientes se enrolaron en cada uno de los grupos de dosis (200 mg, 400 mg, 600 mg y 800 mg por dosis) y recibieron una vez infusiones intravenosas diarias durante 7 días. Antes de la dosificación, se extrajo una muestra de sangre de cada paciente para evaluación del genotipo del virus HCV.

[00214] ARN de HCV en el plasma se determinó en valores de referencia (un promedio de 2 mediciones pre-tratamiento tomadas el Día 1 o pre-tratamiento y el Día 1) y una vez diariamente antes de la iniciación de la primera infusión intravenosa diaria de isatoribina los Días 2 a 7 para estos grupos de dosificación (x 7 días) diaria. Véase Figura 2. La carga vírica se cuantificó por el método de ADN ramificado (Versant™ v3.0 bDNA assay, Bayer Diagnostics). Para el ARN de HCV en el plasma, se calculó la variación máxima de los valores de referencia de pre-tratamiento usando valores transformados logarítmicamente.

[00215] El ARN de HCV en el plasma disminuyó durante el desarrollo del tratamiento de isatoribina, ocurriendo las mayores variaciones por lo general en pacientes que recibieron las dosis diarias más altas (Figura 2). Ocho de 12 pacientes que recibieron isatoribina 800 mg QD x 7 días mostraron una disminución de carga vírica plasmática de más de 0.5 log 10 unidades, con una variación media en estos 12 pacientes de -0.76 log 10 unidades y un margen de -2.85 a +0.21 log10 unidades. Esta disminución

en la carga vírica fue estadísticamente significativa para el grupo de dosis 800 mg QD (p=0.008). La carga vírica plasmática declina por lo general en forma inversa luego de cesar el tratamiento.

Bioanálisis Vírico Basado en replicones de HCV

[00216] Se ha demostrado que los replicones de HCV son sumamente sensibles a los efectos inhibidores de interferón-α e interferón-γ. Pr lo tanto, el replicón de HCV se vuelve un sistema muy útil para medir la cantidad de interferones biológicamente activos en sobrenadantes de PBMCs humanas, estimuladas con un agonista TLR7. Se desarrolló un análisis cuantitativo, el cual se basó en la cuantificación de la actividad del gen indicador de luciferasa que se integró en un replicón de HCV. Usando este sistema, interferones de PBMCs tratadas con agonista TLR7 se midieron y se evaluó su actividad inhibidora usando el replicón de indicador de luciferasa.

[00217] PBMCs humanas aisladas de un donante sano se pusieron en pocillos replicados de cultivo de células (5 x 10^6 células por pocillo). Las PBMCs se incuban en la ausencia de compuestos de prueba a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO_2 durante 24 horas para permitir la estabilización a las condiciones de cultivo y, luego, el ligando TLR7 o un control libre de medicamento se agrega a pocillos replicados que contienen PBMCs del mismo donante. Las concentraciones de ligando TLR7 pueden variarse para ajustarse al experimento particular, y los cultivos PBMC se incuban entonces a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO_2 durante ocho horas. Se toman las muestras de sobrenadante de cultivo de células en el punto de tiempo 8 horas (o el punto de tiempo veinticuatro horas en el caso de Loxoribina y sus profármacos) de ligando TLR7 tratado y pocillos de control, y se analizan con respecto a la producción de interferón α mediante ELISA. Sobrenadantes de células tratadas con compuesto y un control sin medicamento se diluyeron 1:10, 1:100, y 1:1000 en medio RPMI y se aplicaron a una placa de 96 pocillos de células hepatocitos Huh7 que contenían el replicón de indicador de luciferasa. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C en un

incubador de cultivo de tejido.

[00218] Luego del período de incubación, las palcas de 96 pocillos se lavaron 2X con PBS y se sometieron a lisis con tampón de lisis pasivo (Promega). Las palcas se agitaron a temperatura de la sala durante 20 minutos y reactivo estándar de análisis de luciferasa (Promega) se agrega a cada pocillo mediante inyección, y se lee la palca en un luminómetro Lmax (Molecular Devices). Las unidades lumínicas relativas aproximadas se convierten en una inhibición porcentual que se compara con los pocillos de control sin medicamento para determinar el nivel de inhibición observado en el análisis de replicones. Se determinó que la concentración máxima calculada de interferones requerida para inhibir la replicación de replicones de HCV estaba en una dilución 1:10 de sobrenadante de células estimuladas con PBMC, que caía dentro de nuestro margen de prueba de la serie de diluciones. Para todos los agonistas TLR7 probados, se observó una inhibición del 100% en el sistema de replicón indicador de luciferasa con la dilución 1:10.

[00219] Los datos consignados en Tablas 3-8 representan la inhibición del sistema de replicones de HCV por el sobrenadante recolectado, luego de la exposición de células PBMC al compuesto con una concentración inicial para el tiempo de incubación indicado, y diluido como se especifica en la primera columna ("PBMC expuesta al compuesto"). Un sobrenadante, recolectado de células PBMC no expuestas al compuesto y diluido como se especifica en la primera columna, se utilizó como control ("Sobrenadante Blanco"). Las células PBMC se aislaron de un único donante de sangre como se especificaba.

Tabla 3: Efecto Anti-vírico de la Isatoribina en el Bioanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 100μM

Donante de sangre No.: FL72035

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:100	0	100
1:1000	0	94

No. 2

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 100 μM

Donante de sangre No.: FL75287

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	0	87
1:1000	0	6

No. 3

Tiempo de incubación: 24 horas

Concentración inicial: 100 μM

Donante de sangre No.: FL75864

	Inhibición de replicones de HCV, %	
Dilución de sobrenadante	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	23	99
1:1000	0	64

Tabla 4: Efecto Anti-vírico de la Loxoribina en el Bioanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 24 horas

Concentración inicial: 100 μM

Donante de sangre No.: FL75864

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	23	74
1:1000	0	17

Tabla 5: Efecto Anti-vírico del Imiquimod en el Bioanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 3.2 μM

Donante de sangre No.: FL75287

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	0	100
1:1000	0	89

No. 2

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 3.2 μM

Donante de sangre No.: FL75287

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	3	100
1:100	13	75
1:1000	3	1

Tabla 6: Efecto Anti-vírico del Resiquimod en el Bioanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 10 μM

Donante de sangre No.: FL75287

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	0	98
1:1000	0	21

No. 2

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 10 μM

Donante de sangre No.: FL75287

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	3	100
1:100	13	88
1:1000	3	6

Tabla 7: Efecto Anti-vírico de la Bropirimina en el Bioanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 100 μM

Donante de sangre No.: FL72035

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	0	95
1:1000	0	0

No. 2

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 100 μM

Donante de sangre No.: FL72036

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	8	95
1:1000	0	33

Tabla 8: Efecto Anti-vírico del Derivado de Adenina en el Boanálisis de Replicones de HCV *in vitro*

No. 1

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 0.1 μM

Donante de sangre No.: FL76418

Forma del compuesto: una sal de TFA

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	3	73
1:1000	3	0

No. 2

Tiempo de incubación: 8 horas

Concentración inicial: 0.1 μM

Donante de sangre No.: FL76418

Forma del compuesto: una sal de TFA

Dilución de sobrenadante	Inhibición de replicones de HCV, %	
	PBMC Blanco	PBMC expuestas a compuesto
1:10	0	100
1:100	3	64
1:1000	3	9

6.3 Preparación de Profármacos de Ligando TLR7

[00220] Compuestos de la invención pueden sintetizarse usando la

metodología descrita en los Esquemas anteriores 1-18. A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas se indican en grados Celsius y todas las partes y porcentajes son en peso. Los reactivos se adquieren de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company o Lancaster Synthesis Ltd., y se utilizan sin posterior purificación, a menos que se indique lo contrario. Tetrahidrofurano (THF) y N,N-dimetilforamida (DMF) se adquieren de Aldrich en frascos Sure Seal (sello seguro) y se emplean tal como se reciben. A menos que se indique lo contrario, los siguientes disolventes y reactivos se destilan bajo una nube de nitrógeno seco. THF y Et_2O se destilan de cetilo de Na-benzofenona; CH_2Cl_2 (DCM), diisopropilamina, piridina y Et_3N se destilan de CaH_2; MeCN se destila primero de P_2O_5, luego de CaH_2; MeOH se destila de Mg; PhMe, EtOAc e i-PrOAc se destilan de CaH_2; TFAA se purificó mediante destilación atmosférica simple bajo argón seco.

La reacciones expuestas se realizan generalmente bajo una presión positiva de argón en una temperatura ambiente (a menos que se indique lo contrario) en disolventes anhidros, y los matraces de reacción de ajustan con tabiques de goma para la introducción de sustratos y reactivos mediante una jeringa. La cristalería se seca en horno y/o se seca por calor. Las reacciones se analizan por TLC y se terminan según se estime por el consumo de material de partida. La cromatografía de capa delgada (TLC) se lleva a cabo en placas 60 F254 0.2 mm de gel de sílice con refuerzo de aluminio (EM Science), y se visualiza con luz UV (254 nm) seguida por calentamiento con ácido fosfomolíbdico etanólico comercial. La cromatografía preparativa de capa delgada (TLC) se efectúa en placas 60 F254 1.0 mm de gel de sílice con refuerzo de aluminio (EM Science), y se visualiza con luz UV (254 nm). La HPLC se realiza en un sistema Waters Micromass ZQ conformado por una bomba de gradiente binaria, modelo 2525 con un detector Alltech modelo 800 ELSD y un detector de arreglo de fotodiodo Waters, modelo 996.

[00221] Los desarrollos (***"work-ups"***) se hacen típicamente doblando el volumen de reacción con el disolvente de reacción o el disolvente de

extracción y lavando luego con las soluciones acuosas indicadas, usando 25% en volumen del volumen de extracción, a menos que se indique lo contrario. Las soluciones de producto se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y/o Mg_2SO_4 antes de la filtración y evaporación de los disolventes bajo presión reducida en un evaporador rotatorio y se anotan como disolventes retirados *in vacuo*. La cromatografía de columna se completa bajo presión positiva usando gel de sílice con tamaño de malla 230-400 ó alúmina neutra con tamaño de malla 50-200. La hidrogenólisis se realiza a la presión indicada en los ejemplos, o a presión ambiente.

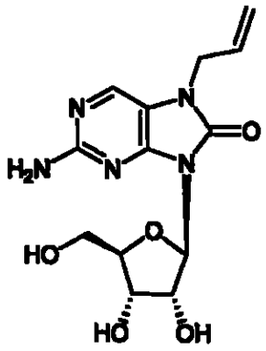
[00222] Los espectros ^{1}H-NMR se registran en un instrumento Varian Mercury-VX400 que opera a 400 MHz y los espectros ^{13}C-NMR se registran operando a 75 MHz. Los espectros NMR se obtienen como soluciones de $CDCl_3$ (indicadas en ppm), usando cloroformo como el estándar de referencia (7.27 ppm y 77.00 ppm), CD_3OD (3.4 y 4.8 ppm y 49.3 ppm), DMSO-d_6, o internamente tetrametilsilano (0.00 ppm), cuando fuera apropiado. Los demás disolventes NMR se usan, según necesidades. Cuando se indican los múltiplos de picos, se utilizan las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), m (multiplete), br (ampliado), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes). Las constantes de acoplamiento, cuando se dan, se indican en Hertz (Hz).

[00223] Los espectros infrarrojo (IR) se registran en una Thermo Nicolet Avatar 370 FT-IR como aceites puros o sólidos y, si se dan, se indican en números de onda (cm^{-1}). Los espectros de masa relacionados (+)-ES Thermo Finnegan LCQ LC/MS fueron realizados por el Departamento de Química Analítica en Anadys Pharmaceuticals, Inc. Los análisis elementales se llevan a cabo por el Atlantic Microlab, Inc. en Norcross, GA o por NuMega, en San Diego, CA. Los puntos de fusión (mp) se determinan en un aparato capilar abierto, y no se corrigen.

[00224] Las rutas sintéticas descritas y los procedimientos experimentales utilizan muchas abreviaturas química comunes, THF (tetrahidrofurano), DMF (N,N-dimetilformamida), EtOAc (acetato de etilo),

DMSO (sulfóxido de dimetilo), DMAP (4-dimetilaminopiridina), DBU (1,8-diazaciclo[5.4.0]undec-7-eno), DCM (4-(dicianometilen)-2-metil-6-(4-dimetilamino-estiril)-4-H-pirano), MCPBA (ácido 3-cloroperoxibenzoico), EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato), HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HOBT (hidrato de 1-hidroxibenzotriazol), TFAA (anhídrido trifluoroacético), pyBOP (benzotriazol-1-iloxi) tripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato), DIEA (diisopropiletilamina), y similares.

Ejemplo 1: **7-Alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona (43)**



Paso 1: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-1H-purin-6,8-diona (**40**)

[00225] Una mezcla heterogénea de 7-alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-1*H*-purin-6,8-diona **17** (1.00 g, 2.95 mmol, preparada de acuerdo con Reitz *et al.*, *JMC*, 37, 3561-3578 (1994)), DMAP (0.036 mg, 0.29 mmol) y NEt_3 (2.05 mL, 14.74 mmol) se agitó en acetonitrilo seco (25 mL). Anhídrido acético (0.862 mL, 9.13 mmol) se agregó lentamente a la suspensión y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se retiró bajo vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (DCM). La fase orgánica se lavó luego con bicarbonato de sodio acuoso saturado ($NaHCO_3$), salmuera, y seguidamente se secó con sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$). El disolvente se concentró bajo vacío y se secó a temperatura de la sala bajo vacío elevado para producir 1.33 g de **40** (97%) como un sólido amarillo pálido: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.12 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J =

3.6 Hz, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.39 (br s, 2H), 5.21 (m, 2H), 4.58 (br s, 2H), 4.51 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 466.2 *m/z*.

Paso 2: Preparación de 7-Alil-2-amino-6-cloro-9-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-purin-8-ona (**41**)

[00226] Compuesto **40** (0.65 g, 1.39 mmol) se disolvió en oxicloruro de fósforo (10 mL) y se calentó a 75 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo vacío y el producto crudo se disolvió en DCM. La mezcla se lavó luego con solución de $NaHCO_3$, salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se filtró. El filtrado se concentró bajo vacío y se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente de 10 a 50% de acetato de etilo en hexanos. El retiro del disolvente produjo 280 mg (41%) del producto deseado **41**: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.04 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.86 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.18 (m, 4H), 4.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.45 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.31 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 484.2 *m/z*.

Paso 3: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-purin-8-ona (**42**)

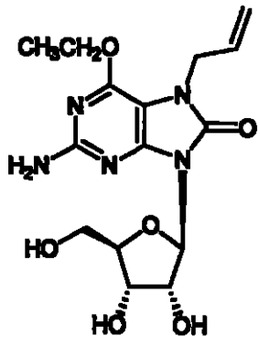
[00227] Compuesto **41** (0.27 g, 0.56 mmol) se disolvió en ácido acético y se agregó una pareja Zn-Cu a la solución. La mezcla se calentó a 70 °C durante 18 horas. Las partículas suspendidas se extrajeron por filtración y el filtrado se concentró bajo vacío. El residuo se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente de 10% a 100% de acetato de etilo en hexanos. El disolvente se retiró para producir 150 mg (60 %) de **42** como un sólido blancuzco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.05 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.87 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.83 (m, 1H), 5.48 (br s, 2H), 5.33 (s, 1H), 5.29 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.27 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 450.0 *m/z*.

Paso 4: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona (**43**)

[00228] A una solución de **42** (0.13 g, 0.29 mmol) en metanol (4 mL)

se agregó K_2CO_3 sólido (0.024g, 0.17 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. A la mezcla turbia se agregó Amberlita CG-50 (0.5 g) y se agitó hasta que se volvió neutra y se filtró. El filtrado se concentró para producir un sólido blancuzco, el cual se lavó con agua y se secó bajo vacío elevado para producir 93.5 mg de **43** puro en rendimiento cuantitativo como un sólido blancuzco: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.88 (s, 1H), 6.33 (br s, 2H), 5.85 (m, 1H), 5.66 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.89 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.75 (br s, 1H), 4.35 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 8.4 Hz, 1) 3.80 (q, J = 3.6 Hz, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.44 (m, 1H). MS (+)-ES $[M+H]^+$ 324.1 *m/z*.

Ejemplo 2: **7-Alil-2-amino-6-etoxi-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona (45)**



Paso 1: Preparación de 7-Alil-2-amino-6-etoxi-9-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-purin-8-ona (**44**)

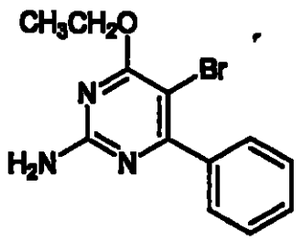
[00229] A una solución de 40 (0.30 g, 0.64 mmol) en THF seco (15 mL) se agregó trifenilfosfina soportada en polímero (0.89 g, 1.93 mmol) y EtOH (0.11 mL, 1.93 mmol) a temperatura de la sala. A la mezcla en agitación se agregó dietil azodicarboxilato (0.12 mL, 0.77 mmol) y la agitación continuó durante 18 horas. El polímero utilizado se extrajo por filtración y el disolvente se retiró bajo vacío. El residuo se purificó entonces por cromatografía de destello usando una gradiente de 10 a 50% de acetato de etilo en hexanos. El retiro del disolvente produjo 85 mg (26%) del producto deseado **6** como un aceite claro: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.07 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 3.6

Hz, 1H), 5.96 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.14 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.80 (br s, 2H), 4.46 (m, 4H), 4.37 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.29 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 494.1 *m/z.*

Paso 2: Preparación de 7-Alil-2-amino-6-etoxi-9-β-D-ribofuranosil-7,9-dihidro-purin-8-ona (45)

[00230] A una solución de **44** (0.084 g, 0.17 mmol) en metanol (4 mL) se agregó K_2CO_3 sólido (0.014g, 0.17 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la mezcla turbia se agregó Amberlita CG-50 (0.5 g) y se agitó hasta que se volvió neutra y se filtró. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía de destello usando 100% DCM a 10 % de metanol en DCM. El retiro del disolvente produjo 62 mg de 7 (99%) como un aceite claro: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.93 (m, 1H), 5.25 (d, J = 32.4, Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.02 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.62 (br s, 2H), 4.47 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.25-4.45 (m, 3H), 4.21 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 3.77 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.14, J_{AB} = 12.4 Hz, 2H), 1.37 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.27 (t, 7.6, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 368.0 *m/z.*

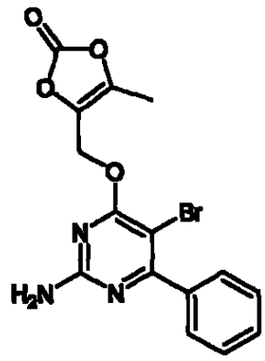
Ejemplo 3: **5-Bromo-4-etoxi-6-fenil-pirimidin-2-ilamina (37)**



Paso 1: Preparación de 5-Bromo-4-etoxi-6-fenil-pirimidin-2-ilamina (37)

[00231] En una manera similar a paso 2 de Ejemplo **2** se preparó el compuesto del título como un sólido blanco de 2-amino-5-bromo-6-fenil-3H-pirimidin-4-ona **35** (Wierenga, *et al., JMC,* 23, 239-240 (1980)) en 13% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (m, 2H0, 7.42 (m, 3H), 5.15 (br s, 2H), 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.44 (t, 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 294.1 $[M+2]^+$ 296.0 *m/z.* Análisis elemental para $C_{12}H_{12}BrN_3O$: calculado: C, 49.00; H, 4.11; N, 14.29; hallado: C, 48.94; H, 4.18; N, 14.01.

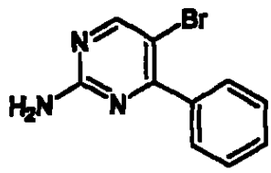
Ejemplo 4: **4-(2-Amino-5-bromo-6-fenil-pirimidin-4-iloximetil)-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona (46)**



Paso 1: Preparación de 4-(2-Amino-5-bromo-6-fenil-pirimidin-4-iloximetil)-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona (**46**)

[00232] En una manera similar a paso 2 de Ejemplo **2** se preparó el compuesto del título como un sólido blanco de 2-Amino-5-bromo-6-fenil-3H-pirimidin-4-ona **35** en 4% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.62 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 5.18 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 2.26 (s, H); MS (+)-ES $[M]^+$ 378.2 $[M+2]^+$ 380.1 *m/z*. Análisis elemental para $C_{15}H_{12}BrN_3O_4$: calculado: C, 47.64; H, 3.20; N, 11.11; hallado: C, 46.98; H, 3.23; N, 10.70.

Ejemplo 5: **5-Bromo-4-fenil-pirimidin-2-ilamina (48)**



Paso 1: Preparación de 4-Fenil-pirimidin-2-ilamina (**47**)

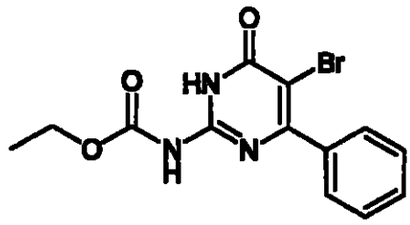
[00233] A una solución de bromobenceno (4.43 mL, 42.06 mmol) en THF seco (100 mL) a -78 °C se agregó BuLi (394 mL, 63.08 mmol) y la mezcla se dejó agitar a -78 °C durante 2 horas. A esto se agregó 2-aminopirimidina (2.0 g, 21.03 mmol) en tolueno caliente (80 mL) en un período de 15 minutos. La mezcla se hizo refluir por 16 horas y se dejó enfriar a temperatura de la sala y se atemperó cuidadosamente con $NaHCO_3$ acuoso. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró bajo vacío. El residuo se disolvió luego en DCM y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso, salmuera y se

secó ($MgSO_4$). El disolvente se retiró para producir 350 mg de **47** (10%) como un sólido amarillo pálido: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 7.02 (J = 4.8 Hz, 1H). 5.27 (br s, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 172.2 *m/z*.

Paso 2: Preparación de 5-Bromo-4-fenil-pirimidin-2-ilamina (**48**)

[00234] Compuesto **47** (0.30 g, 1.75 mmol) se disolvió en ácido acético glacial (15 ml) y se calentó a 45 °C. Br_2 (0.09 mL, 1.75 mmol) se agregó lentamente. La mezcla resultante se dejó agitar entonces a temperatura de la sala durante 3 horas. El disolvente se retiró bajo vacío para dejar un residuo sólido. Éste se transfirió a un embudo filtrante y se lavó con DCM, seguido por agua. El sólido restante se secó luego bajo vacío elevado durante 16 horas para producir 197 mg de **13** (45%) como un sólido amarillo pálido: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.40 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 6.96 (s, 2H); MS (+)-ES $[M]^+$ 250.0 $[M+2]^+$ 252.0 *m/z*. Análisis elemental para $C_{10}H_8BrN_3$: calculado: C, 48.02; H, 3.22; Br, 31.95; N, 16.80; hallado: C, 47.91; H, 3.28; Br, 32.15; N, 16.80.

Ejemplo 6: **Etil éster de ácido (5-bromo-6-oxo-4-fenil-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-carbámico (36)**

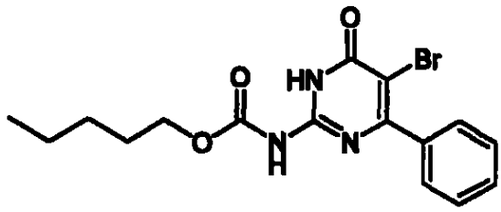


Paso 1: Preparación de etil éster de ácido (5-bromo-6-oxo-4-fenil-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-carbámico (**36**)

A una solución de **35** (0.25g, 0.94 mmol) en DMF (8 mL) se agregó NEt_3 (0.14 mL, 0.99 mmol) y dietil pirocarbonato (0.27 mL, 1.89 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a 65 °C durante 20 horas. El disolvente se retiró y el residuo se trató con DCM. La mezcla resultante se filtró para retirar el material de partida restante **35** y el filtrado se lavó con $NaHCO_3$ acuoso, salmuera y se secó ($MgSO_4$). El filtrado se concentró y se purificó por HPLC (columna Thomson ODS-A 100A 5μ 150 x 21.2 mm; caudal =

30 mL/min; CH_3CN con 0.05 % TFA (A), agua con 0.05 % TFA (B); flujo de la bomba de reposición (***"caudal de la bomba de reposición"***) = 0.9 mL/min; fase móvil de la bomba de reposición; MeOH con 0.05% TFA usando un sistema de gradiente en la siguiente forma: t = 0; 15 % A, 85 % B; t = 3.0 min; 15 % A, 85 % B; t = 9.5 min; 70 % A, 30 % B; t = 10.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.5 min; 15 % A, 85 % B; t = 15.0 min; 15 % A, 85 % B.) para producir 54 mgs de **36** (17%) como un aceite claro: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66 (m, 1H), 7.44 (m, 3H), 4.26 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.32 t, *J* = 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 338.1 $[M+2]^+$ 340.0 *m/z*. Análisis elemental para $C_{13}H_{12}BrN_3O_3$: calculado: C, 46.17; H, 3.58; N, 12.43; hallado: C, 46.43; H, 3.74; N, 11.95.

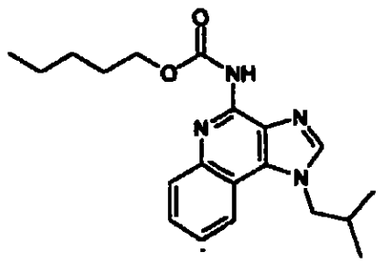
Ejemplo 7: **Pentil éster de ácido (5-bromo-6-oxo-4-fenil-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-carbámico (49)**



Paso 1: Preparación de pentil éster de ácido (5-bromo-6-oxo-4-fenil-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-carbámico (**49**)

[00235] En una manera similar a paso 1 de Ejemplo 6 el compuesto del título se preparó de **35** y dipentil pirocarbonato como un aceite claro en 9% de rendimiento luego de purificación por HPLC (columna Thomson ODS-A 100A 5 μ, 150 x 21.2 mm; caudal = 30 mL/min; CH_3CN con 0.05 % TFA (A), Agua con 0.05 % TFA (B); caudal de la bomba de reposición = 0.9 mL/min; fase móvil de la bomba de reposición; MeOH con 0.05% TFA usando un sistema de gradiente en la siguiente forma: t = 0; 35 % A, 65 % B; t = 3.0 min; 35 % A, 65 % B; t = 10 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 12.5 min; 35 % A, 65 % B; t = 15.0 min; 35 % A, 65 % B.). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69 (br s, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H), 4.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.64 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.34 (m, 4H), 0.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 380.1 $[M+2]^+$ 382.1 *m/z*.

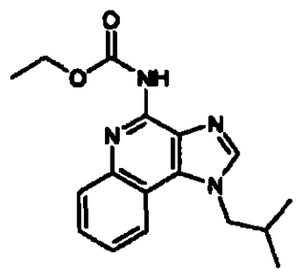
Ejemplo 8: **Pentil éster de ácid (1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il)-carbámico (34)**



Paso 1: Preparación de pentil éster de ácido (1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il)-carbámico (34)

[00236] A una suspensión de 1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-ilamina **31** (0.15 g, 0.62 mmol, preparada de acuerdo con el procedimiento divulgado en WO94/17043) en $CHCl_3$ (5 mL) se agregó NEt_3 (0.09 mL, 0.65 mmol) y dipentil pirocarbonato (0.231 g, 0.94 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 60 horas. La mezcla de reacción se lavó con $NaHCO_3$ acuoso, salmuera $MgSO_4$. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente 10% a 70% de acetato de etilo en hexanos para producir 50.5 mg de **34** (23%) como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (br s, 1H), 8.15 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.43 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (m, 1H), 1.75 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.36 (m, 4H), 1.06 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 355.3 *m/z.*

Ejemplo 9: **Etil éster de ácido (1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il)-carbámico (50)**

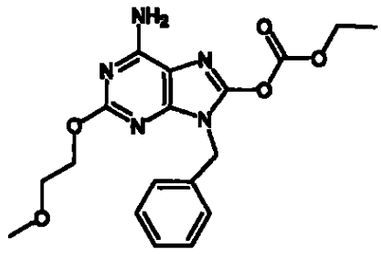


Paso 1: Preparación de etil éster de ácido (1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il)-carbámico (50)

[00237] En una manera similar a paso 1 de Ejemplo 8 se preparó el

compuesto del título como un sólido blanco de **31** y dietil pirocarbonato en 67% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.32 (br s, 2H), 8.2 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H) 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H) 4.43 (m, 4H), 2.35 (m, 1H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 313.2 *m/z*.

Ejemplo 10: **Etil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (51)**



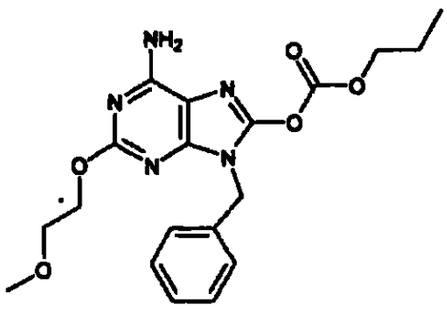
Paso 1: Preparación de etil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-8-il éster de ácido carbónico **(51)**

[00238] 6-Amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-ol, **29** (11.75 mg, 0.027 mmol, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito por Kurimota, *et al., Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1091-109 (2004) se suspendió en CH_2Cl_2 (0.6 mL) y se enrió a 0 °C. DIEA (11.96 μL, 0.068mmol) y cloroformiato de etilo (3.86 mg, 0.036 mmol, agregado como un solución al 10% en volumen en diclorometano) se agregaron entonces a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 minutos, luego se dejó calentar a temperatura de la sala durante 15 minutos. La TLC de la mezcla de reacción muestra que quedó el material de partida. La mezcla de reacción se calentó a 35 °C, se agregó DMAP (cat.), metanol (porciones de 60 μL) para disolver **29**, y se agregaron otras alícuotas de cloroformiato de etilo (3.86 mg, 0.036 mmol, añadido como una solución al 10% en volumen en diclorometano) hasta que la reacción estuvo completa. La mezcla cruda se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente 0 a 100% de acetato de etilo en hexano. Se recogieron los picos deseados y se concentraron *in vacuo* para obtener 8.5 mg (80%) de compuesto **51** como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = Hz, 2H), 7.27

(m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.46 (m, 4H), 3.74 (m, 2H), 3.42 (s, 2H), 1.46 (t, 3H); MS [M+H]+ m/z 388.3.

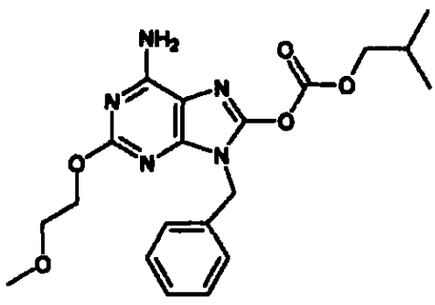
[00239] Ejemplos 11-20 se prepararon de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-8-ol, **29** y el cloroformiato apropiado de acuerdo con el procedimiento descrito en Ejemplo 10.

Ejemplo 11: **Propil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (52)**



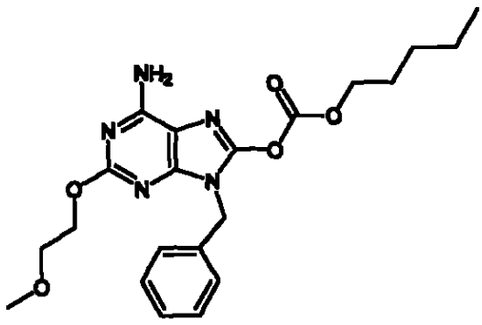
86% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.46 (m, 4H), 3.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 402.2.

Ejemplo 12: **Isobutil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (53)**



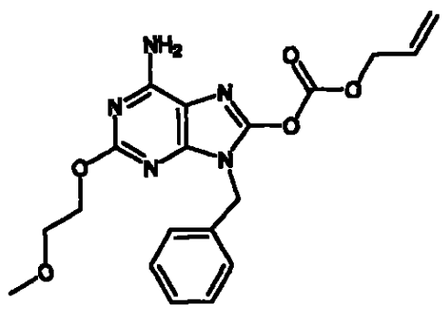
[00240] 92% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.4 Hz 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.45 (m, 2H), 4.17 (d, J =7.4 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.4 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 6H); MS [M+H]+ m/z 416.3.

Ejemplo 13: **Pentil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (54)**



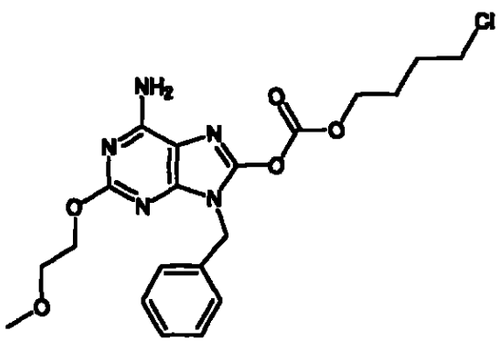
[00241] 92% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.45 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.4 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.82 (m, 2H), 1.40 (m, 4H), 0.93 (t, J = 6.8 Hz, 3H); MS [M+H]+ *m/z* 430.2.

Ejemplo 14: **6-Amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de alil éster de ácido carbónico (55)**



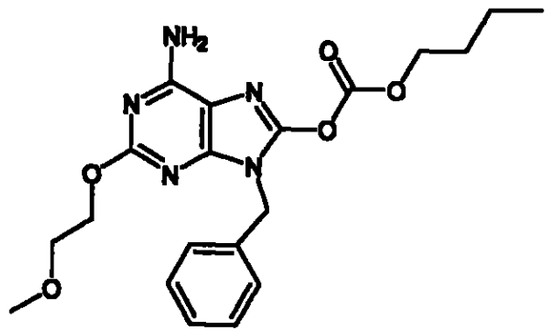
[00242] 93% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (m, 3H), 6.0 (m, 1H), 5.5 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.89 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.46 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.74 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H); MS [M+H]+ m/z 400.2.

Ejemplo 15: **4-Cloro-butil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (56)**



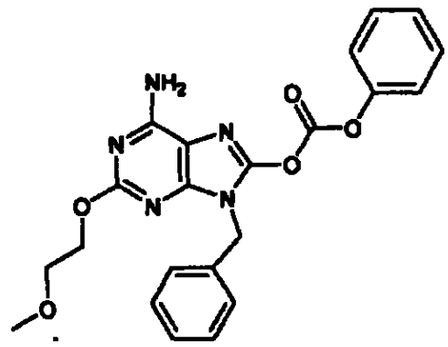
[00243] 98% de rendimiento como un sólido blanco: 1H ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.45 (m, 4H), 3.63 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.99 (m, 4H); MS [M+H]+ m/z 450.2.

Ejemplo 16: **Butil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-8-il éster de ácido carbónico (57)**



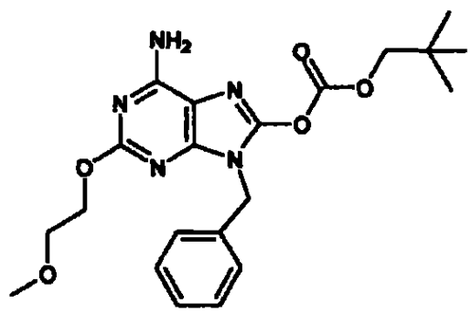
[00244] 100% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.41 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.48 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 416.2.

Ejemplo 17: **Fenil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (58)**



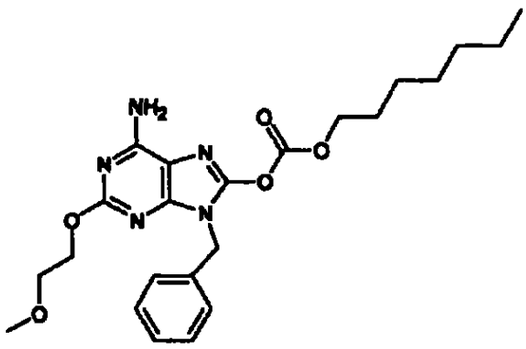
[00245] 100% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.30 (m, 3H), 7.25 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.47 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H); MS [M+H]+ m/z 436.2.

Ejemplo 18: **2,2-Dimetil-propil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-8-il éster de ácido carbónico (59)**



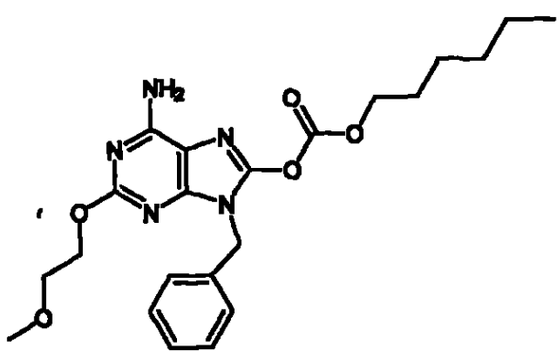
[00246] 100% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.43 (d, 2H), 7.25 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.47 (t, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.75 (t, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.07 (s, 9H); MS [M+H]+ m/z 430.2.

Ejemplo 19: **Heptil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-8-il éster de ácido carbónico (60)**



[00247] 100% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.46 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.74 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.8 (m, 2H), 1.4 (m, 2H), 1.3 (m, 6H) 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 458.3.

Ejemplo 20: **Hexil éster de 6-amino-9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-8-il éster de ácido carbónico (30)**

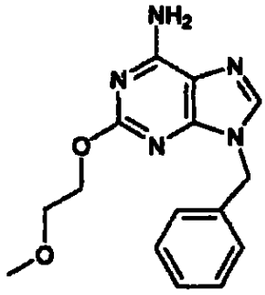


[00248] 74% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400

MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 7.27 (m, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.45 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.41 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.81 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.26 (m, 2H), 0.89 (t, J = 2 Hz, 3H); MS [M+H]+ m/z 444.4.

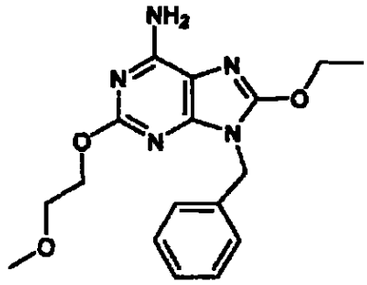
[00249] Ejemplos 22 y 23 se prepararon de 9-bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-6-ilamina, **62**, medainte 9-bencil-8-bromo-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-6-ilamina, **63** y etóxido de sodio o metóxido respectivamente de acuerdo con los procedimeitnos de Kurimota *et al, Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1091-1099 (2004).

Ejemplo 21: **9-Bencil-2-(2-metoxi-etoxi)-9H-purin-6-ilamina (62)**



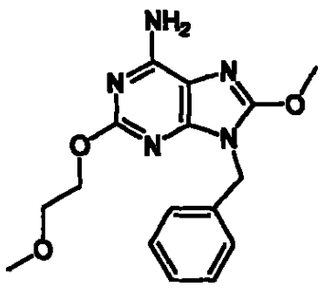
[00250] 100% de rendimiento como un sólido marrón: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.59 (s, 1H), 7.27 (m, 5H), 5.83 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.49 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 300.2.

Ejemplo 22: **9-Bencil-8-etoxi-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-6-ilamina (64)**



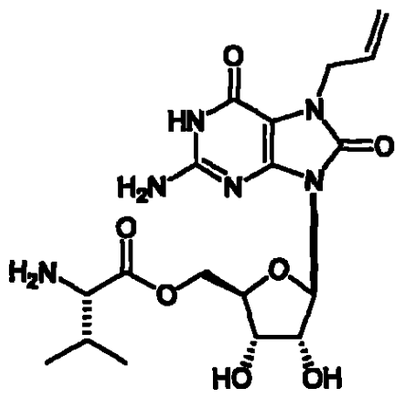
[00251] 91% de rendimiento como un sólido marrón: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.24 (m, 2H), 7.24 (m, 3H), 5.00 (s, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.27 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.26 (s, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS $[M+H]^+$ *m/z* 344.1.

Ejemplo 23: **9-Bencil-8-metoxi-2-(2-metoxi-etoxi)-9*H*-purin-6-ilamina (65)**



[00252] 91% de rendimiento como un sólido marrón: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.28 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 6.86 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.26 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.58 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H); MS [M+H]+ *m/z* 330.2.

Ejemplo 24: **7-Alil-2-Amino-9-(5'-O-L-valinil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-1*H*-purin-6,8-diona (68)**



Paso 1: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-1H-purin-6,8-diona (**66**)

[00253] Compuesto **17** (0.17g, 0.49 mmol) se disolvió en DMF (4.0 mL) y se agregó acetona (3.0 mL) a la solución. A la mezcla se agregó 2,2-dimetoxipropano (0.18 mL, 1.47 mmol) y $MeSO_3H$ (0.02 mL, 0.05mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 20 horas y se atemperó con $NaHCO_3$ acuoso saturado. En seguida se extrajo la fase acuosa (4x) con CH_2Cl_2. La fase orgánica combinada se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró bajo vacío para producir 130 mg de **66** en 70% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.93 (m, 1H), 5.34 (dd, *J* = 4.4, 2.0 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 5.12 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.52 (d, *J* = 5.6, 2H),

4.16 (m, 1H), 3.71 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.36 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 380.0 *m/z*.

Paso 2: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3'-O-isopropiliden-5'-N-terc-butoxicarbonil-L-valinil)-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-1H-purin-6,8-diona (**67**)

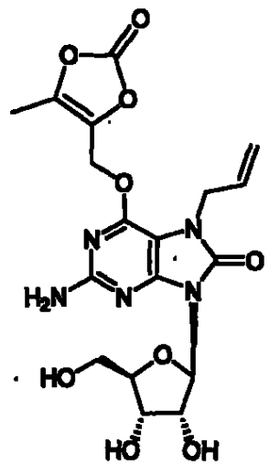
[00254] Una mezcla de **66** (0.13 g, 0.34 mmol), BOC-Valina (0.08 g, 0.36 mmol), EDC (0.07g, 0.38 mmol), DMAP (0.05g, 0.38 mmol) en THF (8.0 mL) y piridina (0.8 mL) bajo atmósfera N_2 se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los disolventes se retiraron bajo vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó $NaHCO_3$ acuoso saturado, salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se filtró. El filtrado se concentró bajo vacío y se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente 2% a 5% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir 180 mg de **67** (91%) como un sólido amarillo pálido: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.07 (s, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.56 (br s, 2H), 5.41 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.15 (m, 3H), 4.97 (br s, 1H), 4.53 (br s, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M]^+$ 578.9 *m/z*.

Paso 3: 7-Alil-2-Amino-9-(5'-O-L-valinil-β-D-ribofuranosil)-7,9-dihidro-1H-purin-6,8-diona (**68**)

[00255] A una solución de **67** (0.18 g, 0.311 mmols) en MeOH (10 mL) se agregó AcCl (0.86 mL, 12.07 mmol) bajo atmósfera N_2. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y, seguidamente, se neutralizó cuidadosamente con $NaHCO_3$ acuoso saturado. A la mezcla se agregó gel de sílice y se concentró bajo vacío. El residuo se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente 10% a 20% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir 80 mg de **68** (59%) como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.72 (br s, 2H), 5.84 (m, 1H), 5.59 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.15 (br s, 1H), 5.07 (d, J = 12 Hz, 1H), 5.0 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 4.77 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (m, 3H), 4.26 (t, J = *AA* Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.57 (br s, 1H), 2.01 (m, 1H), 0.86 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 5.2 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$

439.1 *m/z.*

Ejemplo 25: **7-Alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-6-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-7,9-dihidro-purin-8-ona (71)**



Paso 1: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)- 7,9-dihidro-1H-purin-6,8-diona (**69**)

[00256] A una solución de **17** (0.46 g, 1.36 mmol) e imidazol (0.93 g, 13.64 mol) en DMF (13 mL) se agregó clorotrietilsilano (0.92 mL, 5.46 mmol) gota a gota y se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La mezcla de reacción se trató con $NaHCO_3$ acuoso saturado y las dos fases resultantes se separaron. La fase acuosa se lavó con éter dietílico (2x). Las capas orgánicas de combinaron y se lavaron con agua, se secaron ($MgSCO_4$) y se concentraron luego de la filtración. El residuo se purificó por cromatografía de destello usando una gradiente 2% a 10% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir 830 mg de **69** (89%) como un aceite amarillo pálido: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.92 (m, 1H), 5.85 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.3 (m, 1H), 5.15 - 5.23 (m, 2H), 5.09 (br s, 2H), 4.54 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.33 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.67 - 3.80 (m, 2H), 0.85 - 1.02 (m, 26H), 0.48 - 0.71 (m, 19H): MS (+)-ES[M]$^+$ 682.6 *m/z.*

Paso 2: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-(2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)-6-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-7,9-dihidro-purin-8-ona (**70**)

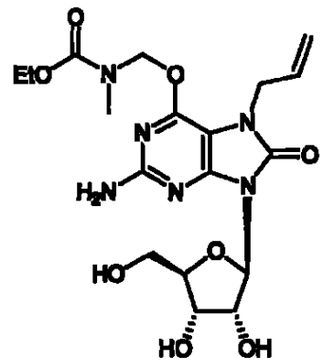
(00257] En una manera similar a Paso 1 de Ejemplo 2, compuesto **70** se preparó de compuesto **69** y 4-hidroximetil-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona

(preparada de acuerdo con el procedimiento de Alepegiani, *Syn. Comm.*, 22(9), 1277-82 (1992)) en 5% de rendimiento como un sólido blanco luego de la purificación por HPLC (columna Thomson ODS-A 100A 5u 50 x 21.2 mm; caudal = 30 mL/min; CH_3CN con 0.05 % TFA (A), agua con 0.05 % TFA (B); caudal de la bomba de reposición = 1.0 mL/min; fase móvil de la bomba de reposición; MeOH con 0.05% TFA usando un sistema de gradiente en la siguiente forma: t = 0; 50 % A, 50 % B; t = 2.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 5.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 9.5 min; 100 % A, 0 % B; t = 10.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 13.0 min; 50 % A, 50 % B.); MS (+)-ES $[M]^+$ 794.1 *m/z*.

Paso 3: Preparación de 7-Alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-6-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-7,9-dihidro-purin-8-ona (71)

[00258] A una solución de **70** (9.0 mg, 0.012 mmol) en MeOH (1.5 mL) se agregó $3HF{\cdot}NEt_3$ (0.01 mL, 0.07 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se retiró bajo vacío y el residuo se purificó por cromatografía de destello. El producto deseado se eluyó con una gradiente 2% a 5% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir 3.26 mg de **71** (64%) como un sólido blanco: ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 5.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.17 (m, 4H), 4.96 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.25 (J = 5.2 Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 3.81 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.17, J_{AB} = 11.6 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H): MS (+)-ES $[M+H]^+$ 452.4 *m/z*.

Ejemplo 26: **Etil éster de ácido (7-alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-8-oxo-8,9-dihidro-7*H*-purin-6-iloximetil)-metil-carbámico (73)**



Paso 1: Preparación de etil éster de ácido (7-alil-2-amino-9-*(2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)*-8-oxo-8,9-dihidro-*7H*-purin-6-iloximetil)-

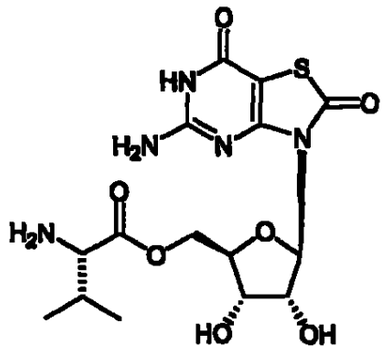
metil-carbámico (72)

[00259] En una manera similar a Paso 1 de Ejemplo 2 compuesto 72 se preparó en 4% de rendimiento a partir del compuesto 69 y *N-metil-N-(hidroximetil)uretano* (Kelper, *JOC,* 52, **1987,** p.453-455) como un sólido blanco luego de la purificación por HPLC: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.94 (m, 1H), 5.82 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.53 (br s, 1H), 5.23 - 5.29 (m, 2H), 5.15 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.35 (br s, 1H), 4.21 (m, 2H), 3.96 (br s, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 1.30 (m, 4H), 0.87 - 1.01 (m, 24H), 0.57 - 0.68 (m, 19H): MS (+)-ES $[M+H]^+$ 797.7 *m/z.*

Paso 2: Preparación de etil éster de ácido (7-alil-2-amino-9-β-D-ribofuranosil-8-oxo-8,9-dihidro-7H-purin-6-iloximetil)-metil-carbámico (73)

[00260] En una manera similar a Paso 3 de Ejemplo 25 se preparó el compuesto del título 73 en 64% de rendimiento como un sólido blanco luego de la purificación por HPLC (columna Thomson ODS-A 100A 5μ 50 x 21.2 mm; caudal = 30 mL/min; CH_3CN con 0.05 % TFA (A), agua con 0.05 % TFA (B); caudal de la bomba de reposición =1.0 mL/min; fase móvil de la bomba de reposición; MeOH con 0.05% TFA usando un sistema de gradiente en la siguiente forma: t = 0; 50 % A, 50 % B; t = 2.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 5.0 min; 100 % A, 0 % B; t = 9.5 min; 100 % A, 0 % B; t = 10.0 min; 50 % A, 50 % B; t = 13.0 min; 50 % A, 50 % B.). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.92 (m, 1H), 5.92 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.51 (m, 2H), 5.22 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 6.0, 2H), 4.40 (d, J = 6.0, 1H), 4.21 (m, 3H), 3.79 (ABq, $\Delta\upsilon_{AB}$ = 0.178, J_{AB} = 14.0 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H): MS (+)-ES $[M]^+$ 455.4 *m/z.*

Ejemplo 27: **5-Amino-3-(5'-O-L-valinil-β-D-ribofuranosil)tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona diclorhidrato (24)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-3-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosil)tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona (22)

[00261] A una mezcla heterogénea de **21** (5.37 g, 17.0 mmol, preparada de acuerdo con el procedimiento divulgado en la Patente de los Estados Unidos No. 5,041,426 (Ejemplo 2), la cual se incorpora por referencia en su totalidad, en acetona (40 mL) contenida en un matraz Morton de 250 mL se agregó sucesivamente 2,2-DMP (6.26 mL, 50.9 mmol), DMSO (6.6 mL), y $MeSO_3H$ (220 μL, 3.39 mmol) a temperatura de la sala. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente, volviéndose homogénea y se consumió un amarillo dorado como el diol. El análisis por TLC (SiO_2, 10% MeOH-$CHCl_3$) indicó que la reacción se había completado luego de 6 horas. Se retiraron los sólidos sin disolver mediante filtración por gravedad usando papel de filtro tipo Whatman corrugado. Esto se siguió por vertimiento del filtrado en 10 volúmenes de agua helada (~400 mL), resultando en una precipitación inmediata de un sólido blanco. Tras un breve período de agitación, se agregó $NaHCO_3$ (285 mg, 3.39 mmol) disuelto en agua (10 mL) para neutralizar el $MeSO_3H$. Se continuó una agitación vigorosa en el reactor Morton durante 15 minutos, luego de lo cual la mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio grueso sinterizado. El material sólido se lavó con agua helada (100 mL), se secó por aire, y luego se secó aún más bajo vacío elevado a 65 °C, produciendo 5.36 g (88%) del acetónido **22** como un sólido blanco: mp 280-81 °C; ^1H (DMSO-d_6) δ 1.28 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 3.43-3.55 (m, 2H), 3.95-3.99 (m, 1H), 4.77-4.80 (m, 1H), 4.88-4.91 (m, 1H), 5.24-5.26 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.97 (br s, 2H), 11.25 (s, 1H).

Paso 2: Preparación de 5-Amino-3-(2',3'-O-isopropiliden-5'-N-terc-

butoxicarbonil-L-valinil)-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona (**23**)

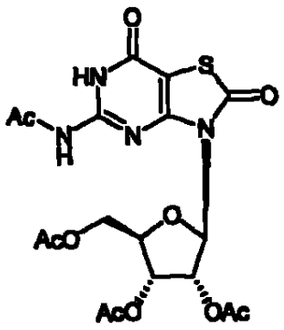
[00262] A una solución de *N*-butoxicarbonil-(L)-valina (671 mg, 2.81 mmol) en THF (9 mL) a 0 °C se agregó EDC (588 mg, 3.07 mmol). La mezcla homogénea resultante se agitó 45 minutos a 0 °C, punto en el cual se había vuelto heterogénea, y se agregó el acetónido sólido 2 del Paso 1 anterior (1.00 g, 2.81 mmol) como una porción. A continuación se agregó DMAP sólido (522 mg, 4.27 mmol). Se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura de la sala, y se agitó 5 horas más, luego de lo cual se concentró a 25 °C mediante evaporación rotatoria a un jarabe amarillo. El residuo se disolvió en EtOAc (50 mL), se repartió en porciones con 1 N HCl (10 mL) seguido por la neutralización de $NaHCO_3$ acuoso saturado ácido (10 mL). La fase acuosa ácida se extrajo aún más con EtOAc (2 x 50 mL), y luego se repartió en porciones con la fase acuosa básica. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron a través de una corta almohadilla de SiO_2, y se concentraron, produciendo 1.480 g (96%) de éster de aminoácido Boc-protegido **23** como una espuma: mp 158 °C (dec); ^1H ($CDCl_3$) δ 0.86 (d, J = 7.0, 3H), 0.95 (d, J = 7.0, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.56 (s, 3H), 1.75 (brs, 1H), 2.08-2.19 (m, 1H), 4.20-4.24 (m, 2H), 4.30-4.37 (m, 1H), 4.56 (dd, J = 11.0, 5.9, 1H), 4.96 (dd, J = 6.2, 3.7, 1H), 5.11 (br d, J = 8.8, 1H), 5.29 (br d, J = 6.6, 1H), 5.88 (brs,2H), 6.23 (s, 1H).

Paso 3: Preparación de 5-Amino-3-(5'-O-L-valinil-β-D-ribofuranosil) tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona diclorhidrato (**24**)

[00263] Un chorro de gas de HCl gas se pasó por un generador de burbujas de H_2SO_4 concentrado y, seguidamente, se dirigió (mediante un tubo de dispersión de frita) en un matraz Morton de 3 cuellos de 250 mL que contenía acetato de isopropilo (80 mL) a 0 °C hasta que se obtuvo una solución saturada. A esta se agregó una solución de éster de Boc-aminoácido del Paso 2 anterior (5.53 g, 9.95 mmol) en acetato de isopropilo (30 mL), resultante en la formación de un precipitado sólido blanco en un término de 5 minutos. A esto se agregó 10% (v/v) IPA (11 mL). La mezcla

de reacción se calentó a temperatura de la sala, luego se agitó 12 horas. La mezcla de reacción heterogénea se diluyó con tolueno seco (100 mL). La filtración usando un embudo de vidrio sinterizado de poro mediano bajo N_2 proporcionó un sólido amorfo blancuzco. La trituración del sólido en THF seco fue seguido por filtración y secamiento por vacío a 65 °C, produciendo 3.677 g (81%) del compuesto del título **24** como un sólido blanco: mp 166-68 °C (dec); ^{1}H (DMSO-d_6) δ 0.90 (d, J = 7.0, 3H), 0.94 (d, J = 7.0, 3H), 2.14-2.18 (m, 1H), 3.83-3.85 (m, 1H), 3.96-4.00 (m, 1H), 4.23-4.28 (m, 2H), 4.42 (dd, J = 11.7,3.4, 1H), 4.75 (dd, J = 10.3, 5.5, 1H), 5.81 (d, J =4.4, 1H), 6.46 (br s, 3H), 7.23 (br s, 2H), 8.47 (s, 3H), 11.5 (br s, 1H). Análisis elemental para $C_{15}H_{21}N_5O_7S \cdot 2HCl$: calculado: C, 36.89; H, 4.75; Cl, 14.52; N, 14.34; S, 6.57; hallado: C, 37.03: H, 4.74; Cl, 14.26; N, 14.24; S, 6.42.

Ejemplo 28: **5-Acetilamino-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil) tiazolo[4,5-*d*]pirimidin-2,7(6*H*)-diona (74)**

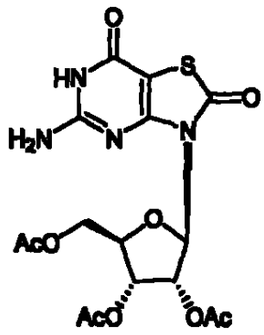


Paso 1: Preparación de 5-Acetilamino-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil) tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7(6H)-diona (74)

[00264] **21** anhidro (8.0 g, 39.5 mmol) se disolvió en piridina seca (65 mL). DMAP (3.1g, 25.3 mmol) y anhídrido acético (19.1 mL 202.4 mmol) se agregaron en forma consecutiva. Se dejó continuar la reacción durante 2 horas a temperatura de la sala, luego de lo cual se atemperó con $NaHCO_3$ saturado (100 mL) y se extrajo con DCM (3 x 200 mL). La fase orgánica se concentró, y luego se trituró con éter. Esto proporcionó 12.5 g (103%) de 5-acetilamino-3-(2,3,5-tri-*O*-acetil-β-D-ribofuranosil)tiazolo-[4,5-*d*]pirimidin-2,7(6H)-diona ligeramente impura como un sólido blanco **74**:

mp 246.7-248.1 °C; R_f = 0.20 (SiO_2, 50% EtOAc-$CHCl_3$); ^1H NMR (400MHz, d_6-DMSO) δ 12.23 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 5.97 (m, 2H), 5.48 (t, *J* = 6, 1H), 4.35-4.40 (m, 1H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.08-4.18 (m, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

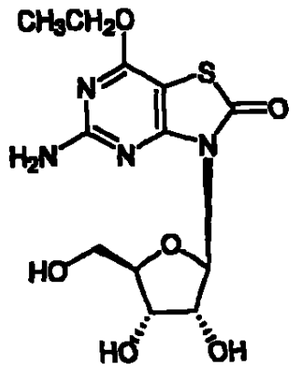
Ejemplo 29: **5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)tiazolo [4,5-*d*]pirimidin-2,7(6*H*)-diona (75)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil) tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7(6H)-diona (75)

[00265] A una suspensión de **21** (5.00 g, 15.8 mmol) en acetonitrilo (160 mL) a 0 °C se agregaron sucesivamente Et_3N (11.0 mL, 79.0 mmol), DMAP (195 mg, 1.59 mmol), y Ac_2O (4.47 mL, 47.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas, luego de lo cual se concentró a un jarabe marrón. El residuo se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, MeOH/$CHCl_3$ = 1-10%) para producir 6.22 g (89%) de triacetato **75** como un sólido blanco: mp 198-199 °C; ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 11.34 (s, 1H), 7.02 (br s, 2H), 5.90 (m, 2H), 5.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.08 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 443.3.

Ejemplo 30: **5-Amino-7-etoxi-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-*d*] pirimidin-2-ona (77)**



Paso 1: Preparación de 5-Acetilamino-7-etoxi-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**76**)

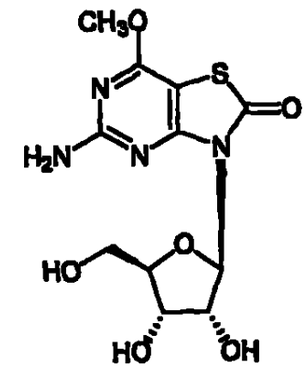
[00266] En una manera similar a Ejemplo 2, paso 1, **76** se preparó de **74** y etanol en 72% de rendimiento como una espuma blanca: MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 513. R_f= 0.45 (75% Acetato de etilo-$CHCl_3$).

Paso 2: Preparación de 5-Amino-7-etoxi-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**77**)

[00267] En una manera similar a Ejemplo 2, paso 2, el compuesto del título se preparó de **76** en 65% de rendimiento como un sólido blanco: ^1H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.87 (s, 2H), 5.85 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.27 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.09 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 1.29 (m, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 445, $[2M+H]^+$ *m/z* 689. R_f = 0.2 (50% THF-$CHCl_3$).

Análisis elemental para $C_{12}H_{16}N_4O_6S \cdot 0.25\ H_2O$: calculado: C, 41.31; H, 4.77; N, 16.06; S, 9.19. Hallado: C, 41.24; H, 4.71; N, 15.89; S, 9.06.

Ejemplo 31: **5-Amino-7-metoxi-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-*d*] pirimidin-2-ona (79)**



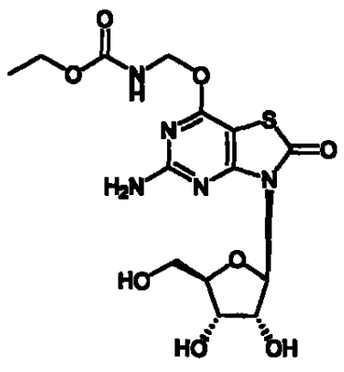
Paso 1: Preparación de 5-Acetilamino-7-metoxi-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (78)

[00268] En una manera similar a Ejemplo 2, paso 1, 77 se preparó de 74 y metanol en 65% de rendimiento como una espuma blanca: MS (+)-ES $[M+H]^+$ 499. R_f= 0.5 (75% acetato de etilo-$CHCl_3$).

Paso 2: Preparación de 5-Amino-7-metoxi-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (79)

[00269] En una manera similar a Ejemplo 2, paso 2, el compuesto del título se preparó de 78 en 78% de rendimiento como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 6.91 (s, 2H), 5.86 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.75 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.43 (m, 1H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 331. R_f= 0.2 (50% THF-$CHCl_3$). Análisis elemental para $C_{11}H_{14}N_4O_6S \cdot 0.25\ H_2O$: calculado: C, 39.46; H, 4.37; N, 16.73; S, 9.58. Hallado: C, 39.59; H, 4.17; N, 16.55; S, 9.52.

Ejemplo 32: **Etil éster de ácido (5-amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosil-2,3-dihidro-tiazolo[4,5-*d*]pirimidin-7-iloximetil)-carbámico (82)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-3-{2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona (**80**)

[00270] A una suspensión de **21** (1.00 g, 3.16 mmol) en DMF (20 mL) a temperatura de la sala se agregó sucesivamente imidazol (753 mg, 11.06 mmol), DMAP (39 mg, 0.32 mmol), y clorotrietilsilano (1.64 mL, 9.80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas, luego de lo cual se atemperó con solución de $NaHCO_3$ saturado (20 mL). La mezcla se extrajo con $CHCl_3$ (3 x 20 mL), se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, MeOH/$CHCl_3$ = 1-5%) para producir 1.91 g (92%) de compuesto **80** como un sólido blanco: ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 5.99 (s, 1H), 5.62 (br s, 2H), 5.19 (dd, *J* = 4.4, 6.0 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 2.8, 4.4 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.77 (dd, *J* = 7.6, 10.8 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 4.8, 10.4 Hz, 1H), 1.10 (t, 7=7.1 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* =7.1 Hz, 3H), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.68 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 0.61 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H), 0.54 (m, 2H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 660.0.

Paso 2: Preparación de etil éster de ácido 5-Amino-3-{2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)-2,3-dihidro-tiazolo[4,5-d]pirimidin-7-iloximetil)-carbámico (**81**)

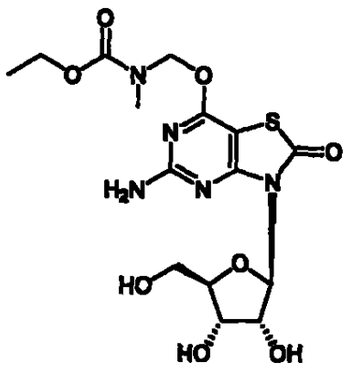
[00271] En una manera similar a Paso 1 de Ejemplo 2, compuesto **81** se preparó de 80 y *N*-etiluretano como un sólido blanco en 31% de rendimiento: $[M+H]^+$ 760.5; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.43 (br s, 2H), 6.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 5.19 (dd, *J* = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 4.19 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.76 (dd, *J* = 10.8, 7.6 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 1H), 1.29 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.02 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 0.69 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.61 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.55 (m, 2H); $[M+H]^+$ 760.5.

Paso 3: Preparación de etil éster de ácido (5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosil-2,3-dihidro-tiazolo[4,5-d]pirimidin-7-iloximetil)-carbámico (**82**)

[00272] Una solución de **81** (244 mg, 321 μmol), 5M HF en piridina

(321 µL, 1.60 mmol) y THF (3.20 mL) se agitaron a temperatura de la sala durante 5 horas. El retiro de los disolventes bajo vacío dejó un residuo que se purificó por cromatografía de destello (SiO_2, 10% MeOH-$CHCl_3$) para producir **82** (119 mg, 90%) como un sólido blanco: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.43 (br s, 1H), 7.76 (br s, 2H), 5.82 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.78 (s, 2H), 5.32 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.24 (dd, J = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.82 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.68 (t, J = 6.0, 1H), 4.11 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.78 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 418.2.

Ejemplo 33: **Etil éster de ácido (5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosil-2,3-dihidro-tiazolo [4,5-*d*]pirimidin-7-iloximetil)-metil-carbámico (84)**



Paso 1: Preparación de etil éster de ácido (5-Amino-2-oxo-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-2,3-dihidro-tiazolo[4,5-d]pirimidin-7-iloximetil)-metil-carbámico (**83**)

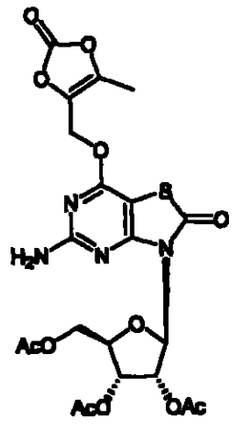
[00273] En una manera similar a Ejemplo 2, paso 1, compuesto **83** se preparó de **75** y *N*-metil-*N*-(hidroximetil)uretano como un sólido blanco en 24% de rendimiento: R_f = 0.4 (33% EtOAc-$CHCl_3$); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.49 (br s, 1H), 6.08 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.75 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.49 (dd, J = 13.5, 8.4 Hz, 1H), 4.30 (m, 5H), 3.62 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.36 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.20 (t, J = 6.8 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 614.2.

Paso 2: Preparación de etil éster de ácido (5-Amino-2-oxo-3-β-D-ribofuranosil-2,3-dihidro-tiazolo[4,5-d]pirimidin-7-iloximetil)-metil-carbámico (**84**)

[00274] En una manera similar a Ejemplo 1, paso 4, el compuesto del

título se preparó de **83** como un sólido blanco en 20% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.86 (br s, 2H), 5.82 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.31 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.82 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.67 (q, J = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.78 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 1.27 (t, J = 6.8 Hz, 3H); $[M+H]^+$ 432.3.

Ejemplo 34: **5-Amino-7-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-3-(2',3',5'-tri-*O*-acetil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-*d*]pirimidin-2-ona (85)**

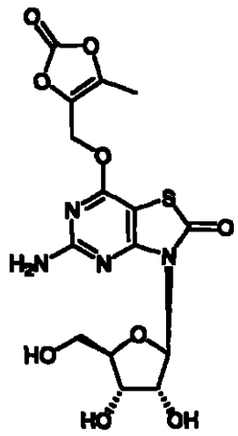


Paso 1: Preparación de 5-Amino-7-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona **(85)**

[00275] A una solución de triacetato **75** (1.55 g, 3.50 mmol) en THF (50 mL) a 0 °C se agregó trifenilfosfina soportada en polímero (4.95 g, 10.50 mmol, Argonaut). A esta mezcla se agregó 4-hidroximetil-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona (0.91 g, 7.00 mmol), preparada de acuerdo con el procedimiento de Alepegiani, *Syn. Comm.*, 22(9), 1277-82 (1992). En seguida se agregó dietil azodicarboxilato (0.73 ml, 4.60 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a temperatura de la sala durante 48 horas, se filtró y se lavó con MeOH y $CHCl_3$. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, acetona/$CHCl_3$ = 10-20%) para producir el derivado de dioxolona **85** (1.38 g, 71%) como un sólido blanco: ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO); δ 7.06 (s, 2H), 6.00 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.92 (dd, J = 6.6, 4.4 Hz, 1H), 5.56 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.38 (dd, J = 11.6, 3.6 Hz, 1H), 4.25 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 4.10 (q, J = 6.0 Hz,

1H), 2.23 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 555.3. Análisis elemental calculado para $C_{21}H_{22}N_4O_{12}S \cdot Me_2CO$: C, 47.06; H, 4.61; N, 9.15; S, 5.23. Hallado: C, 47.25; H, 4.37; N, 9.53; S, 5.52.

Ejemplo 35: **5-Amino-7-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-*d*]pirimidin-2-ona (87)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-7-(5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-3-(2',3',5'-tris-O-trietilsilanil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**86**)

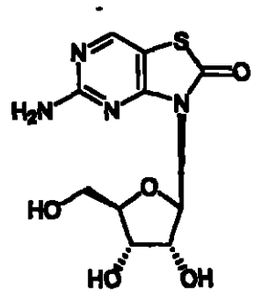
[00276] En una manera similar a Ejemplo 34, compuesto **86** se preparó de **80** y 4-hidroximetil-5-metil-[1,3]dioxol-2-ona como un sólido blanco en 45% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.06 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.21 (dd, *J* = 6.0, 4.8 Hz, 1H), 5.18 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.94 (br s, 2H), 4.38 (dd, *J* = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.79 (dd, *J* = 11.2, 8.0 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 10.8, 5.2 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.02 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.89 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H), 0.70 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 0.61 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.53 (m, 2H); $[M+H]^+$ 771.5.

Paso 2: Preparación de 5-Amino-7-(5-metil-2-oxo-[1,3] dioxol-4-ilmetoxi)-3-β-D-ribofuranosil-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**87**)

[00277] En una manera similar a Pasos 3 de Ejemplo 32, el compuesto del título se preparó de **86** como un sólido blanco en 89% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.03 (br s, 2H), 5.90 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 5.02 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.83 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* =

6.0 Hz, 1H), 4.14 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.80 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 2.27 (s, 3H); $[M+H]^+$ 429.2.

Ejemplo 36: **5-Amino-3-β-D-ribofuranosil-3*H*-tiazolo-[4,5-*d*] pirimidin-2-ona (90)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-7-tioxo-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**88**)

[00278] A una solución de **75** (1 g, 2.26 mmol) en piridina (50 mL) se agregó a temperatura de la sala P_2S_5 (2.13 g, 4.79 mmol). La solución se hizo refluir suavemente (temperatura del baño 130-140 °C) durante 29 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad *in vacuo*. El exceso de P_2S_5 se descompuso mediante la adición de H_2O (40 mL) a 60 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora a 60 °C y luego se enfrió a temperatura de la sala. La mezcla se extrajo con $CHCl_3$ (3 x 40 mL). la capa orgánica secada ($MgSO_4$) se evaporó para producir un jarabe, el cual se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, acetona/$CHCl_3$ = 15%) para producir 0.93 g (90%) de **88** como un sólido amarillo: ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 12.50 (s, 1H), 7.35 (br s, 2H), 5.89 (m, 2H), 5.51 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.10 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 459.3.

Paso 2: Preparación de 5-Amino-3-(2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-3H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**89**)

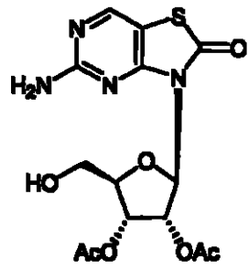
[00279] Una suspensión de níquel Raney® 2800 (3 big spatula, pre-lavado con H_2O, MeOH y acetona) en acetona (50 mL) se agitó a reflujo durante 1 hora. A continuación se agregó triacetato **88** (0.93 g, 2.03 mmol) a la anterior suspensión a reflujo. La mezcla se agitó durante 5 minutos, se enfrió a temperatura de la sala durante 30 minutos. La reacción se

atemperó haciendo burbujear H_2S (g) en la mezcla durante 2 horas. La mezcla resultante se filtró a través de una corta almohadilla de Celita® y se lavó con EtOH. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, MeOH/$CHCl_3$= 1-2%) para producir 0.52 g (60%) de **89** como un sólido blanco: mp 121-123 °C; ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.38 (s, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.03 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.93 (dd, J = 6.4, 3.6 Hz, 1H), 5.58 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 11.6, 3.6 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 427.2. Análisis elemental calculado para $C_{16}H_{18}N_4O_8S \cdot 0.5\ CH_3OH \cdot 0.25\ H_2O$: C, 44.34; H, 4.62; N, 12.54; S 7.17. Hallado: C, 44.54; H, 4.88; N, 12.16; S, 7.17.

Paso 3: Preparación de 5-Amino-3-β-D-ribofuranosil-3H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**90**)

[00280] A una solución de **89** (0.52 g, 1.22 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó K_2CO_3 (25 mg, 0.18 mmol). La reacción se agitó a temperatura de la sala de un día para otro, luego se neutralizó con AcOH (21 µL, 0.36 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura de la sala durante 30 minutos más, se concentró, y se trituró con H_2O (2 ml) para producir 0.33 g de compuesto **90** (89%) como un sólido blanco: mp 220 °C (Dec); ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.34 (s, 1H), 6.85 (s, 2H), 5.90 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.98 (d, J =5.6 Hz, 1H), 4.81 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.67 (t, J= 6.0 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (dd, J= 10.8, 4.8 Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.44 (m, 1H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 301.1. Análisis elemental calculado para $C_{10}H_{12}N_4O_5S \cdot 0.3\ H_2O$: C, 39.29; H, 4.15; N, 18.33; S 10.49. Hallado: C, 39.51; H, 4.18; N, 17.95; S, 10.27.

Ejemplo 37: **5-Amino-3-(2',3'-di-*O*-acetil-β-D-ribofuranosil)-3*H*-tiazolo[4,5-*d*]pirimidin-2-ona (93)**



Paso 1: Preparación de 5-Amino-3-(5'-O-terc-butil-dimetilsilanil-β-D-ribofuranosil)-3H-tiazolo[4',5-d]pirimidin-2-ona (**91**)

[00281] A una solución de 90 (0.68 g, 2.28 mmol) en DMF (10 mL) se agregó imidazol (0.54 g, 7.93 mmol) y terc-butildimetilsilil cloruro (0.68 g, 4.56 mmol) en forma consecutiva. La mezcla de reacción se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas, punto en el cual se concentró y se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, $MeOH/CHCl_3$; gradiente - 5-20%) para producir 0.49 g (52%) 91 como un sólido blanco: ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.33 (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 5.90 (d, J =4.0 Hz, 1H), 5.33 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.79 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 4.16 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 12.0, 7.2 Hz, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.00 (s, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 415.4.

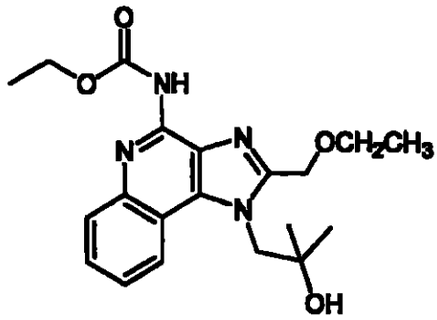
Paso 2: Preparación de 5-Amino-S-(2',3'-di-O-acetil, 5'-O-terc-butil-dimetilsilanil-β-D-ribofuranosil)-3H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona (**92**)

[00282] A una solución de 91 (0.20 g, 0.48 mmol) en acetonitrilo (5 mL) a 0 °C se agregó sucesivamente Et_3N (0.26 mL, 1.86 mmol) y Ac_2O (91 μL, 0.96 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura de la sala durante 24 horas, tras lo cual ésta se concentró y se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, gradiente acetona/$CHCl_3$ = 5-10%) para producir 0.22 g (92%) de **92** como un sólido blanco: ^1H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.36 (s, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.00 (m, 2H), 5.57 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.07 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (d, J = 2.4 Hz, 6H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 499.5. *Paso 3: Preparación de 5-Amino-3-(2',3'-di-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-3H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2-ona* (**93**)

[00283] A una solución de 92 (0.22 g, 0.44 mmol) en THF (5 mL) en

una ampolla plástica se agregó HF/piridina (0.70 mL). La reacción se agitó durante 2 horas, se concentró y se purificó por cromatografía de columna de destello (sílice, gradiente MeOH/$CHCl_3$ - 5-10%) para producir 0.17 g (100%) del compuesto del título como un sólido blanco: mp 109-111 °C; ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 8.37 (s, 1H), 6.91 (s, 2H), 6.00 (m, 2H), 5.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 10.4, 6.0 Hz, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ *m/z* 385.3. Análisis elemental calculado para $C_{14}H_{16}N_4O_7S$·0.5 CH_3OH-0.2 $CHCl_3$: C, 41.61; H, 4.32; N, 13.21; S 7.56: Hallado: C, 41.73; H, 4.29; N, 12.86; S, 7.33.

Ejemplo 38: **Etil éster de ácido [2-etoximetil-1-(2-hidroxi-2-metil-propil)-1*H*-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il]-carbámico (39)**



Paso 1: Preparación de etil éster de ácido [2-etoximetil-1-(2-hidroxi-2-metil-propil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-il]-carbámico (39)

[00284] En una manera similar a paso 1 de Ejemplo 8, excepto que se sustituyó MeOH como el disolvente, se preparó el compuesto del título de 1-(4-amino-2-etoximetil-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-il)-2-metil-propan-2-ol (**38**) (preparado de acuerdo con el procedimiento divulgado en la Publicación Internacional No. WO 94/17043) y dietil pirocarbonato como un aceite en 39% de rendimiento: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 8.05 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 7.70 (t, *J*= 7.2 Hz, 1H), 7.61 (t, *J*= 8.0 Hz, 1H), 4.96 (br s, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.39 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H), 3.62 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H), 1.40 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H), 1.36 (br s, 6H), 1.24 (t, *J*= 6.8 Hz, 3H); MS (+)-ES $[M+H]^+$ 387.4 *m/z*.

6.4 Efecto Enmascarado de los Profármacos de Ligando TLR7

[00285] Un experimento típico usaría células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), aisladas de un donante sano, y se pusieron en pocillos replicados para cultivo de células (***"replicate cell culture wells"***); típicamente, $2x10^6$ a $5x10^6$ se ponen en cada pocillo. Las PBMC se incuban en la ausencia de compuestos de prueba a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5% CO_2 durante 24 horas para permitir la estabilización de las condiciones de cultivo y, luego, se agregan isatoribina 100 micromolar, el ligando TLR7 y un correspondiente profármaco de ligando TLR7 a pocillos separados que contienen PBMC del mismo donante; se incluyen controles no tratados. Las concentraciones de ligando TLR7 y el profármaco de ligando TLR7 pueden variarse para adaptar el experimento particular y, en seguida, los cultivos PBMC se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5% CO_2 durante un período de tiempo que va desde dos horas a 48 horas. Durante la incubación se toman muestras del medio sobrenadante del cultivo de células. Éstas se analizan en cuanto a la producción de citocina mediante ELISA. Adicionalmente, puede analizarse mediante LC-MS la cantidad de ligando TLR7 y profármaco de ligando TLR7 que queda al final de la incubación. La producción de citocina se calcula en relación con la producción en el control isatoribina, luego de la sustracción de la producción de citocina en los controles sin tratar. Los resultados de citocina se comparan para determinar la magnitud en que el ligando TLR7 es más activo que el correspondiente profármaco de ligando TLR7.

[00286] Por consiguiente, si el ligando TLR7 genera más interferón α (una citocina convenientemente cuantificada) que el correspondiente profármaco de ligando TLR7 luego de una duración similar de exposición y concentración, el profármaco de ligando TLR7 puede considerarse profármaco de ligando TLR7 "enmascarado". La magnitud de reducción en la producción de citocina, que constituye "enmascaramiento", puede ser tan baja como una reducción del 25% en relación con el TLR precursor, puesto que esto produciría un incremento correspondiente en la dosis administrada para un nivel dado de tolerabilidad.

[00287] Tablas 9 - 14 proporcionan datos que ilustran que pueden enmascararse ligandos TLR7 de múltiples clases químicas. Los ejemplos indicados demuestran un enmascaramiento sustancial en relación con el ligando de TLR precursor. Las sustituciones químicas señaladas son ejemplares y, en ninguna forma, restrictivas de la invención, puesto que sustituciones químicas adicionales pueden exhibir igualmente enmascaramiento y se contemplan en la invención. El enmascaramiento puede lograrse mediante la introducción de sustituciones en el margen de ubicaciones en cualquier ligando TLR7 y, como se indica, puede incorporarse en una variedad de enlazamientos químicos. Se observará que la sustitución y enlazamiento preferidos pueden variar para diferentes ligandos TLR7 precursores.

Tabla 9: Enmascaramiento de Profármacos de Isatoribina

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a 100 μM, %
Molécula precursora: Isatoribina	21	100
Profármaco: Éster de aminóacido	24	1
Profármaco: Deoxi	93	0
Profármaco: 6-Etoxi	77	0
Profármaco: 6-Metoxi	79	0
Profármaco: Aminal	84	0
Profármaco: Aminal	82	0
Profármaco: Dioxolenona	85	0

[00288] La propiedad enmascarada de los profármacos de isatoribina puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC

(Tabla 9) indican la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 8 horas (val-isatoribina, **24**) ó 24 horas (otros profármacos) a la concentración inicial de 100 μM. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de isotoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

Tabla 10: Enmascaramiento de Profármacos de Loxoribina

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a100 μM, %
Molécula precursora: Loxoribina	**17**	50
Profármaco: 6-Etoxi	**45**	0
Profármaco: Deoxi	**43**	0
Profármaco: Valil éster	**68**	0

[00289] La propiedad enmascarada de los profármacos de loxoribina puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC (Tabla 10) muestran la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 24 horas a la concentración inicial 100 μM. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de isotoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

Tabla 11: Enmascaramiento de Profármacos de Imiquimod

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a 100 μM, %
Molécula precursora: Imiquimod	31	100
Profármaco: Pentil carbamato	34	1
Profármaco: Etil carbamato	50	0

* Resultados de dos experimentos con tres donantes diferentes

[00290] La propiedad enmascarada de los profármacos de imiquimod puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC (Tabla 11) muestran la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 24 horas a la concentración inicial 100 μM. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de isatoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

Tabla 12: Enmascaramiento de Profármacos de Resiquimod

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a 100 μM, %
Molécula precursora: Resiquimod	39	95 @ 1 μM
Profármaco: Etil carbamato	38	9 @ 100 μM

[00291] La propiedad enmascarada de los profármacos de resiquimod puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC (Tabla 12) muestran la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 24 horas a las

concentraciones iniciales de 1 ó 100 μM. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de isatoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

Tabla 13: Enmascaramiento de Profármacos de Bropirimina

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a 100 μM, %
Molécula precursora: Bropirimina	35	22
Profármaco: Deoxi	48	0
Profármaco: Etoxi	37	0
Profármaco: Etil carbamato	36	0
Profármaco: Pentil carbamato	49	0

[00292] La propiedad enmascarada de profármacos de bropirimina puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC (Tabla 13) muestran la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 24 horas a la concentración inicial de 100 μM. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de Isatoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

Tabla 14: Enmascaramiento de los Profármacos de Adenina

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Cantidad de INFα en relación con la inducida por isatoribina a 100 μM, %
Molécula precursora	29	128 @ 0.1 μM

Profármaco: Metoxi	65	0 @ 100 μM
Profármaco: Etoxi	64	0 @ 10 μM
Profármaco: Deoxi	62	0 @ 0.1 μM
Profármaco: Etil carbamato	51	18 @ 32 μM
Profármaco: Pentil carbamato	54	15 @ 10 μM

[00293] La propiedad enmascarada de los profármacos de adenina puede demostrarse en un análisis PBMC. Los resultados del análisis PBMC (Tabla 14) muestran la cantidad de INFα liberado luego de la exposición del compuesto precursor y sus profármacos durante 24 horas a concentraciones iniciales diferentes especificadas en la tabla. La cantidad del INFα liberado se normalizó a la inducida por 100 μM de isatoribina a 100 μM en el mismo donante de sangre con el mismo tiempo de exposición.

[00294] Los profármacos de ligando TLR7 pueden evaluarse asimismo *in vitro* con respecto a su conversión en el ligando TLR7 precursor activo. Ésta puede medirse mediante incubación del profármaco en sangre, plasma, o en un cultivo celular de hepatocitos. A intervalos seleccionados de tiempo, se toman muestras para determinar la cantidad de profármaco restante y la cantidad de ligando TLR7 producida. Tales determinaciones se hacen fácilmente con el empleo de herramientas analíticas conocidas en el arte tales como LC-MS. La determinación de la magnitud de conversión de un profármaco de ligando TLR7 en el ligando TLR7 precursor es útil en la interpretación de los datos en donde el enmascaramiento es evidente en tiempos más cortos, pero disminuye luego de incubaciones prolongadas en el análisis PBMC descrito aquí. La velocidad de conversión del profármaco en el ligando TLR7 puede determinarse para garantizar que los resultados de citocina surgen predominantemente de la exposición al profármaco más que de la exposición al ligando TLR7 generado por la rápida conversión del profármaco bajo las condiciones del experimento.

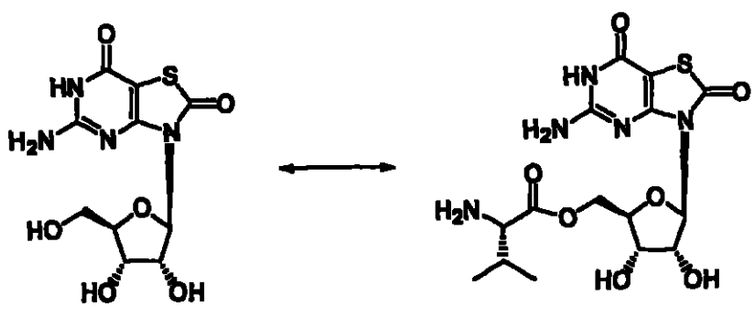
6.5.1 Experimentación Biológica de Profármacos de Ligando TLR7

que Demuestran Disponibilidad Oral Incrementada y Efectos Colaterales Disminuidos

Disponibilidad Oral

[00295] La biodisponibilidad mejorada de los profármacos de ligando TLR7 puede valorarse realizando estudios *in vivo*. En tales experimentos, los profármacos candidatos se administran por vía oral a ratones, ratas, monos, y/o perros, y se toman muestras de sangre en intervalos seleccionados. Las muestras de sangre se analizan en cuanto al profármaco y al ligando TLR7 deseado. Muestras adicionales de sangre o del hígado pueden analizarse con respecto a la presencia de interferones y otras citocinas que indican la activación funcional de la ruta TLR7 *in vivo*. Candidatos deseados demostrarán una exposición sanguínea al profármaco y demostrarán igualmente una exposición sanguínea al ligando TLR7 deseado de alrededor de 10% a 99% de la dosis aplicada, medida en una base molar.

[00296] Un ejemplo representativo es el resultado obtenido con el profármaco de ligando TLR7 val-isatoribina (24), el cual se describe a continuación en el ratón y el perro generando cantidades significativas del ligando TLR7 precursor isatoribina (21) en la sangre. Véase Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/305,061 (incorporada aquí por referencia en su totalidad).



21 24

Concentraciones de Interferón α (Mu-IFN-α) en Ratones

[00297] El ratón normal proporciona un sistema útil para la evaluación del grado en el cual las invenciones descritas aquí aportan un mejora

importante en la administración oral de **21** (isatoribina). No sólo se pueden medir las concentraciones en el plasma de la isatoribina provenientes de la administración oral de dicho profármaco(s), sino que además la extensiva investigación inmunitaria realizada en el ratón ha proporcionado reactivos apropiados para cuantificar los niveles de interferón α, una citocina de interés que refleja una de las actividades biológicas deseadas de la isatoribina.

[00298] Hemos usado el sistema murino en una serie de experimentos que demuestran que **24**, el éster de 5'-valina de **21** (val-isatoribina) produce una respuesta del interferón sustancialmente mejorada sobre la resultante de la administración de isatoribina en sí misma.

[00299] Tabla 15 registra los resultados de un análisis para detectar la presencia de interferón α murino en el plasma de ratones que se recibieron dos veces dosis de isatoribina, formulada en bicarbonato, en un nivel de 50 mg/kg por la vía oral. Es evidente que no podía medirse interferón incluso si la dosis se repetía luego de un intervalo de cuatro horas.

Tabla 15: Concentración de Interferón α (Mu-IFN-α) en el Plasma (pg/mL) en ratones luego de Dos Dosis Orales de 50 mg/kg de Isatoribina en Intervalos de 4 Horas

Tiempo, h	Valor Individual			Media	SD
Primera Dosis					
0.00	BQL^{50}	BQL^{125}	BQL^{50}	0.00	0.00
0.03	BQL^{25}	BQL^{250}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.25	BQL^{50}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.50	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
1.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
1.50	BQL^{100}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
2.00	BQL^{25}	BQL^{75}	BQL^{25}	0.00	0.00
3.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00

Segunda Dosis					
4.03	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.25	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.50	BQL^{50}	$BQL^{37.5}$	BQL^{50}	0.00	0.00
5.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
5.50	$BQL^{37.5}$	$BQL^{37.5}$	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
6.00	BQL^{50}	$BQL^{41.3}$	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
7.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
8.00	BQL^{50}	BQL^{25}	BQL^{50}	0.00	0.00

BQL^{n} – Por debajo del Límite Cuantificado Elevado < n pg/mL.

[00300] Tabla 16 registra los resultados de análisis para determinar interferón α murino en el plasma de ratones que recibieron primero una dosis de bicarbonato y luego, cuatro horas más tarde, se les administró una dosis oral de isatoribina, formulada en bicarbonato, en un nivel de mg/kg. Se dio cuenta de interferón en el plasma de cuatro ratones, incluidos dos que habían recibido la dosis de vehículo bicarbonato. Todos los valores relacionados en este experimento fueron bajos, y los niveles informados de interferón no fueron presentados consistentemente para todos los tres ratones evaluados en cada punto de tiempo, sugiriendo que estas señales pueden ser artefactos provenientes de la medición cerca de los límites inferiores del análisis.

Tabla 16: Concentración de Interferón α (Mu-EFN-α) en el Plasma (pg/mL) en Ratones luego de una Dosis de Vehículo y una Dosis de 50 mg/kg de Isatoribina 4 Horas más tarde

Tiempo, h	Valor Individual			Media	SD
Primera Dosis					
0.00	BQL^{50}	BQL^{100}	$BQL^{62.5}$	0.00	0.00
0.03	BQL^{50}	BQL^{50}	$BQL^{37.5}$	0.00	0.00
0.08	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
0.25	BQL^{50}	$BQL^{62.5}$	BQL^{50}	0.00	0.00
0.50	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{50}	0.00	0.00
1.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{100}	0.00	0.00
1.50	BQL^{50}	BQL^{100}	BQL^{50}	0.00	0.00

2.00	34.9	BQL^{25}	BQL^{25}	11.6	20.15
3.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	35.4	BQL^{100}	11.8	20.44
Segunda Dosis					
4.03	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.08	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.25	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00
4.50	BQL^{100}	BQL^{25}	133.2	44.4	76.90
5.00	74.9	BQL^{50}	NR	37.5	52.96
5.50	BQL^{250}	BQL^{75}	BQL^{25}	0.00	0.00
6.00	BQL^{25}	BQL^{75}	BQL^{75}	0.00	0.00
7.00	BQL^{50}	BQL^{50}	BQL^{25}	0.00	0.00
8.00	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00

BQL^{n} - Por debajo del Límite Cuantificado Elevado < n pg/mL.

NR – No susceptible de informarse.

[00301] Tabla 17 registra los resultados de análisis para detectar interferón α murino en el plasma de ratones a los que se les administró oralmente val-isatoribina, disuelta en bicarbonato, en una dosis que es equivalente a 50 mg/kg de isatoribina sobre una base molar. Es evidente que el interferón fue fácilmente cuantificable a 1.0 hora, 1.5 horas, y 2.0 horas después de la dosificación. El interferón se detectó en todos los ratones examinados en un punto de tiempo dado, indicando la confiabilidad del efecto luego de la administración de la val-isatoribina. Por lo tanto una sola administración de val-isatoribina fue superior a una dosis única o una dosis repetida de isatoribina.

Tabla 17: Concentración en el Plasma (pg/mL) de Interferón α (Mu-IFN-α) en Ratones luego de una Sola Dosis 73.0 mg/kg de Val-Isatoribina

Tiempo, h	Valor Individual			Media	SD
0.00	BQL	BQL^{125}	BQL^{25}	0.00	0.00
0.25	BQL	BQL	BQL	0.00	0.00
0.50	BQL^{25}	BQL^{25}	BQL	0.00	0.00
0.75	BQL	BQL	BQL^{25}	0.00	0.00
1.00	173.2	125.1	89.0	129.1	42.24
1.50	202.9	145.9	294.8	214.5	75.13

2.00	49.2	137.9	138.3	108.5	51.33
3.00	BQL^{25}	NR	NR	0.00	0.00
4.00	BQL^{25}	27.6	BQL	9.20	15.90
5.00	BQL	BQL^{25}	BQL^{25}	0.00	0.00

BQL – Por debajo del Límite Cuantificable < 12.5 pg/mL

BQL^n - Por debajo del Límite Cuantificable Elevado < n pg/mL

NR – No susceptible de informarse

[00302] Los datos tabulados en Tablas 15, 16, y 17 pueden considerarse igualmente desde el punto de vista de la incidencia de los niveles cuantificables de interferón. Se detectó interferón en el plasma de sólo 4 de los 114 usados en los estudios de isatoribina, mientras que 10 de los 30 ratones dosificados con val-isatoribina tuvieron interferón detectable en su plasma. Por consiguiente, el profármaco aumentó la proporción de ratones que exhibieron una respuesta de interferón response de 4% a 30 % y la magnitud de ambas, la respuesta promedio y la pico, se incrementó el doble (100%).

[00303] En otros experimentos, los niveles en el plasma de isatoribina e interferón α se midieron en ratones que se habían dosificado con isatoribina por vía intravenosa, y estos niveles se compararon con los niveles de isatoribina e interferón α resultantes luego de la administración oral de val-isatoribina. Estos datos se recopilan en Figura 1. En esta Figura es evidente que los niveles de interferón α, inducidos por val-isatoribina oral ("val-isator") (con un equivalente molar de 50 mg/kg isatoribina), fueron similares al de la isatoribina intravenosa ("isator") a 25 mg/kg. Por consiguiente, la val-isatoribina oral proporciona niveles de isatoribina e interferón que son aproximadamente 50% de los observados después de la administración intravenosa de isatoribina en sí misma.

Perro Sabueso

[00304] Se investigó el efecto de un profármaco (val-isatoribina, **24**) sobre la exposición sistémica a isatoribina (**21**) luego de la administración oral a perros sabuesos. La isatoribina se preparó en solución de bicarbonato de sodio. La val-isatoribina y la isatoribina se prepararon como las

siguientes formulaciones, las cuales se eligieron para garantizar la solubilidad:

[00305] Formulación 1: Isatoribina en solución de bicarbonato de sodio, 1 y 4 mg/mL.

[00306] Formulación 2: Val-isatoribina en solución salina tamponada con fosfato, 1.62 y 6.48 mg/mL, equivalentes a 1 y 4 mg/mL de isatoribina sobre una base molar.

[00307] Cuatro machos y cuatro hembras de perros sabuesos adultos con pesos entre 15 a 27 kg y de aproximadamente 1-2 años de edad se usaron al comienzo del estudio. Los animales se dividieron en 2 grupos de 2 machos y 2 hembras cada uno. El material de prueba se administró por sonda gástrica los Días 1 y 8, dejando un período de reposo farmacológico de 7 días entre las administraciones. Se recogieron muestras de sangre (2 mL) de cada animal previamente a la dosis, 15, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 horas en tubos con heparina de litio luego de cada dosis. El plasma se congeló a -70 °C hasta el análisis. El plasma se analizó con respecto al contenido de isatoribina mediante valoración de HPLC-MS/MS.

[00308] Los parámetros farmacocinéticos para la isatoribina resultantes de la isatoribina o val-isatoribina en cada perro se resumen en Tablas 18 y 19. Las proporciones para los parámetros farmacocinéticos que definen la concentración máxima (Cmax) y la exposición total medida como el área bajo la curva tiempo-concentración (AUC) para el profármaco y la solución de bicarbonato con la dosis 50 mg/kg se recapitulan en Tabla 20. Para el profármaco **24**, el índice Cmax fue 2.98 ± 0.695 y el índice AUC fue 2.38 ± 0.485. Estos resultados indican que con una dosis de 50 mg/kg, el profármaco val-isatoribina proporcionó un Cmax sustancialmente más alta y una mayor biodisponibilidad que la isatoribina en solución de bicarbonato.

[00309] Los índices para Cmax y AUC para el profármaco respecto a la solución de bicarbonato para la dosis de 10 mg/kg se resumen en Tabla 21. Para el profármaco, el índice Cmax fue 2.24 ± 0.249 y el índice AUC fue 1.82 ± 0.529. Estos resultados indican que con una dosis de 10 mg/kg, el

profármaco val-isatoribina proporcionó un Cmax más elevado y una mayor biodisponibilidad que la isatoribina en solución de bicarbonato.

[00310] Por consiguiente, las concentraciones máximas de isatoribina logradas luego de la dosificación oral son por lo menos el doble, y la exposición sistémica a la isatoribina se incrementa en aproximadamente dos veces luego de la administración oral del profármaco val-isatoribina, comparada con la isatoribina en sí misma, con las dos dosis de 10 y 50 mg/kg.

Tabla 18: Parámetros Farmacocinéticos de la Isatoribina en Perros a los que se Administró una Dosis de 50 mg/kg

	Período de Dosificación	1	2
	Formulación	Isatoribina	Val-isatoribina
Animal No.	Dosis, mg/kg equivalente molar isatoribina	50	50
Perro 3517322	Cmax, ng/mL	3038.7	11741.5
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	15227.0	33038.1
	T1/2, h	6.4	2.4
Perro 3521451	Cmax, ng/mL	3354.0	10652.1
	Tmax, h	1.00	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	9422.2	26552.7
	$T_{1/2}$, h	1.9	1.6

Perro 3528707	Cmax, ng/mL	8915.3	20340.6
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	29701.7	53273.0
	$T_{1/2}$, h	2.2	2.3
Perro 3532828	Cmax, ng/mL	6134.7	15987.9
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	12069.7	32987.0
	$T_{1/2}$, h	1.4	1.6

Tabla 19: Parámetros Farmacocinéticos de la Isatoribina en Perros a los que se Administró una Dosis de 10 mg/kg

	Período de Dosificación	1	2
	Formulación	Isatoribina	Val-isatoribina
Animal No.	Dosis, mg/kg equivalente molar isatoribina	10	10
Perro 3524523	Cmax, ng/mL	4091.5	8594.6
	Tmax, h	1.00	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	13305.8	17166.2
	$T_{1/2}$, h	2.1	1.7
Perro 3526402	Cmax, ng/mL	1859.5	4047.0
	Tmax, h	1.00	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	5774.4	10548.9
	$T_{1/2}$, h	1.6	2.2
Perro 357450	Cmax, ng/mL	1620.3	4228.7
	Tmax, h	0.50	1.00
	AUC(0-inf), ng·h/mL	4387.3	11158.0

	$T_{1/2}$, h	1.5	2.3
Perro 354708	Cmax, ng/mL	2751.2	5784.8
	Tmax, h	0.50	0.50
	AUC(0-inf), ng·h/mL	7522.1	12259.1
	$T_{1/2}$, h	1.6	2.0

Tabla 20: Índice de Parámetros Farmacocinéticos de la Isatoribina en Perros a los que se Administró una Dosis de 50 mg/kg

Animal No.	Formulación	Isatoribina	Val-isatoribina
Perro 3517322	Índice Cmax	1.00	3.86
	Índice AUC	1.00	2.17
Perro 3521451	Índice Cmax	1.00	3.18
	Índice AUC	1.00	2.82
Perro 3528707	Índice Cmax	1.00	2.28
	Índice AUC	1.00	1.79
Perro 3532828	Índice Cmax	1.00	2.61
	Índice AUC	1.00	2.73
	Media Índice Cmax	N/D	2.98
	SD Índice Cmax	N/D	0.695
	Media Índice AUC	N/D	2.38
	SD Índice AUC	N/D	0.485

Tabla 21: Índice de Parámetros Farmacocinéticos de la Isatoribina en Perros a los que se Administró una Dosis de 10 mg/kg

Animal No.	Formulación	Isatoribina	Val-isatoribina
Perro 3524523	Índice Cmax	1.00	2.10
	Índice AUC	1.00	1.29
Perro 3526402	Índice Cmax	1.00	2.18
	Índice AUC	1.00	2.20
Perro 3527450	Índice Cmax	1.00	2.61
	Índice AUC	1.00	2.54
Perro 355708	Índice Cmax	1.00	2.08
	Índice AUC	1.00	1.63
	Media Índice Cmax	N/D	2.24
	SD Índice Cmax	N/D	0.249
	Media Índice AUC	N/D	1.82
	SD Índice AUC	N/D	0.529

[00311] El profármaco val-isatoribina se prefiere por varias razones. Primero, el profármaco se formula fácilmente para proporcionar una elevada proporción de agente activo. Esto se traduce en pequeños tamaños de cápsula para una dosis dada, lo cual constituye una ventaja para un producto oral. Segundo, en las dosis valoradas, la val-isatoribina proporciona niveles en el plasma de isatoribina que están bien dentro del margen deseable para el efecto biológico luego de la administración oral, el cual no es el caso para la isatoribina en sí misma.

Mono Cynomolgus

[00312] De dos a cuatro monos cynomolgus machos o hembras se utilizaron en el estudio de experimentación animal. El compuesto del

estudio se formuló en un vehículo apropiado para administración animal oral o intravenosa. Los vehículos usados fueron tampones acuosos o soluciones que contenían Cremophor. Los animales se dosificaron por sonda gástrica oral o inyección intravenosa rápida para cada artículo de prueba. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 0.5 mL) en puntos de tiempo predeterminados (usualmente, pre-dosis, 15, 30, y 45 minutos y a 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 8 y 24 horas pos-dosis), se pusieron en tubos que contenían EDTA disódico. Las muestras se pusieron en hielo húmedo luego de la recolección, y se separó el plasma en la forma más rápida posible. Las muestras de plasma se pusieron en alícuotas en una sola ampolleta, y se almacenaron congeladas a aproximadamente -20°C hasta el despacho sobre hielo seco al patrocinador. Se suministró alimento y agua a los animales aproximadamente 4 horas después de la dosis.

[00313] Las muestras de plasma se analizaron con respecto a un profármaco y un compuesto precursor usando técnicas bien conocidas de cuantificación LCMS/MS con instrumentos triple quadrupole, es decir, Sciex API3000. Los resultados de la cuantificación para el compuesto precursor, suministrado por administración oral del compuesto precursor mismo o por su profármaco administrado oralmente, se utilizaron para calcular los valores del área-bajo-la-curva (AUC) del tiempo cero a 24 horas (PO AUC0-24h). La comparación de los valores AUC, para el compuesto precursor administrado a la circulación sistémica, con el entregado por el profármaco permitió calcular la biodisponibilidad oral relativa del profármaco. Véase los resultados consignados en las Tablas 22-26. Cuando los datos AUC para compuesto precursor entregado por el compuesto precursor mismo luego de su administración intravenosa estuvieron disponibles (AUC IV), permitieron calcular la biodisponibilidad oral absoluta dividiendo el PO AUC (0-24h) para el profármaco por el IV AUC (0-24h) para la molécula precursora.

Tabla 22: Biodisponibilidad Oral de la Isatoribina y sus Profármacos en Monos

Molécula precursora y sus profármacos	Estructura	Biodisponibilidad oral en mono cynomolgus, %
Molécula precursora: Isatoribina	21	3
Profármaco: Éster de aminóacido	24	7-9*
Profármaco: Deoxi	93	80
Profármaco: 6-Etoxi	77	28
Profármaco: 6-Metoxi	79	21
Profármaco: Aminal	84	14
Profármaco: Aminal	82	4
Profármaco: Dioxolenona	85	17

* Promedio de múltiples experimentos con diferentes dosis.

Tabla 23: Biodisponibilidad Oral de la Loxoribina y sus Profármacos en Monos

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Biodisponibilidad oral en mono cynomolgus, %
Molécula precursora: Loxoribina	17	2
Profármaco: 6-Etoxi	45	9

Profármaco: Deoxi	43	13

Tabla 24: Biodisponibilidad Oral del Imiquimod y sus Profármacos en Monos

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Biodisponibilidad oral en mono cynomolgus, %
Molécula precursora: Imiquimod	31	100 AUC(0-24h) = 9.0
Profármaco: Pentil carbamato	34	555 AUC(0-24h) = 50
Profármaco: Etil carbamato	50	234 AUC(0-24h) = 21.1

Tabla 25: Biodisponibilidad Oral de la Bropirimina y sus Profármacos en Monos

Molécula precursora y sus profármacos	Compuesto No.	Biodisponibilidad oral en mono cynomolgus, %
Molécula precursora: Bropirimina	35	100
Profármaco: Deoxi	48	137*
Profármaco: Etoxi	37	94
Profármaco: Etil carbamato	36	33
Profármaco: Pentil carbamato	49	6

* La biodisponibilidad oral que supere el 100% puede asociarse con diferencias de género, puesto que el compuesto precursor se estudió en monos machos y el profármaco se estudió en monos hembras.

Tabla 26: Biodisponibilidad Oral de Profármacos de Adenina en Monos

Molécula precursora y sus profármacos	Compuestos No.	Biodisponibilidad oral en mono cynomolgus, %
Molécula precursora	29	46
Profármaco: Metoxi	65	1.3
Profármaco: Etoxi	64	4.6
Profármaco: Deoxi	62	0.7
Profármaco: Pentil carbamato	54	9.7

Reducción de la Irritabilidad Gastrointestinal

[00314] Los profármacos de ligando TLR7 de la invención demuestran asimismo efectos toxicológicos inesperados y reducidos en gran medida y, en particular, irritabilidad GI reducida.

[00315] El tracto gastrointestinal ("GI") este recubierto con tejido sustancialmente inmunitario (por ejemplo, parches de Peyer, etc.). Los profármacos de ligando TLR7 ofrecen la perspectiva de enmascarar la estructura activa a medida que el agente pasa a través del tejido linfoide que recubre el intestino, lo cual debe minimizar la activación de este tejido y, con ello, reducir la irritabilidad GI.

[00316] Robins *et al.* han demostrado que la eliminación del 5'-hidroxilo de nucleósido de isatoribina suprime la actividad. *Véase* Robins *et al., Adv. Enzyme Regul.*, 29, 97-121 (1989). Sin entrar en limitaciones

teóricas particulares, se ha planteado la hipótesis de que el bloqueo de este sitio hidroxilo por la sustitución de un éster eliminaría análogamente la actividad, pero permitiría el transporte en la circulación sistémica, donde el éster de valina se descompondría y resultaría en exposición a la isatoribina.

[00317] Hemos descubierto que la hipótesis se confirmó. Se realizaron estudios formales de toxicología de isatoribina, administrada por vía intravenosa, e isatoribina y val-isatoribina, administradas por vía oral, en perros sabuesos. Los resultados toxicológicos para la isatoribina administrada por vía oral provienen de un estudio realizado ICN/Nucleic Acid Research Institute.

[00318] Nosotros comparamos en el perro la toxicología oral de **21** y **24**, y la toxicología intravenosa de **21**. Observamos que la toxicología oral de **24** fue mucho más similar a la intravenosa de **21** de la oral de **21**. En particular, la toxicología limitante de la dosis de la oral **3** fue similar en naturaleza a la de intravenosa **21**, y ocurrió en exposiciones sanguíneas que fueron similares a las observadas luego de la intravenosa **21**. En contraste, la oral **21** tuvo una toxicidad limitante diferente (lesiones gastrointestinales) y su toxicidad se observó con una dosis inferior a la dosis tóxica de cualquiera de las dos, intravenosa **21** u oral **24**. Igualmente, se observó émesis en perros tratados con oral **21** con dosis inferiores a la dosis de oral **24** que resultaron en émesis. *Véase* Tabla 27. Se conocen asimismo otros sistemas para la evaluación de la émesis, tales como en hurones, que permiten la comparación de la administración oral e intravenosa de compuestos. *Véase, por ejemplo,* Strominger N. *et al., Brain Res. Bull,* 5, 445-451 (2001).

[00319] En cada caso el compuesto de administró como una solución, por sonda gástrica o por infusión intravenosa. Se evaluaron múltiples parámetros, como es usual en un estudio de toxicología. En los estudios que proporcionan una exposición potencial más alta a la isatoribina, la concentración plasmática de la isatoribina se evaluó por un método LC/MS. Los notables resultados GI se calificaron y se enumeran en Tabla 27.

TABLA 27: Efecto sobre la Tolerancia GI en Perros luego de la Dosificación de Isatoribina (21) o Val-Isatoribina (24) Catalogado por Exposición Sistémica (AUC) a Isatoribina en Estudios de Toxicología.

		Isatoribina Oral		Isatoribina IV		Val-Isatoribina Oral	
Dosis aplicada equivalente de Isatoribina (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}24\ hrs}$ (µg•hr/ml)	Émesis o materia fecal suelta	Lesiones GI o Irritación	Émesis o materia fecal suelta	Lesiones GI o irritación	Émesis o materia fecal suelta	Lesiones GI o Irritación
2.5	n.d	Neg.	Neg.				
5	n.d.	+	Neg.				
10	n.d.	++	++				
8.1	11.4					Neg.	Neg.
16	15.6					Neg.	Neg.
12.5	19.5			Neg.	Neg.		
32	31.7					Neg.	Neg.
25	42.8			Neg.	Neg.		
64	71					Neg.	Neg.
130	75.3					+	Neg.
50	87.8			+	Neg.		
260	127					++	Neg.
390	180					+++	Neg.
100	209			++	Neg.		

[00320] Para la isatoribina administrada oralmente, los principales resultados se relacionaron con la tolerabilidad GI, medida por irritabilidad GI. Los signos clínicos anotados en Tabla 27 fueron émesis y/o materias fecales sueltas. Estos signos clínicos fueron más frecuentes en el grupo 10 mg/kg, y en un animal con esta dosis se observó una material fecal sanguinolenta. La evaluación histopatológica aproximada del tracto GI registró múltiples lesiones rojas dispersas en la mucosa intestinal en cuatro

de ocho perros con la dosis de 10 mg/kg, la cual en la evaluación microscópica reveló congestión celular y hemorragia, como podría esperarse para un proceso inflamatorio localizado continuo. Los efectos GI establecieron el NOAEL como 5 mg/kg.

[00321] La isatoribina administrada por vía intravenosa resultó en émesis y/o materias fecales sueltas como un hallazgo común en perros; este efecto ocurrió con dosis aplicadas sustancialmente más altas que la isatoribina administrada oralmente. No se observaron lesiones en el tracto GI en la necropsia o la evaluación histopatológica de los tejidos. La tocixidad GI no afectó el NOAEL, el cual se estableció como 12.5 mg/kg sobre la base de otros resultados.

[00322] La val-isatoribina administrada oralmente demostró un perfil de toxicología similar a la isatoribina administrada por vía intravenosa. Con dosis aplicadas más altas, se observaron émesis y materiales fecales sueltas. No se detectaron lesiones GI, aunque este fue un foco de evaluación en el presente estudio. Al igual que para la isatoribina administrada por vía intravenosa, el NOAEL se estableció sobre la base de otros hallazgos. La correspondencia de la toxicidad observada con las exposiciones sistémicas de isatoribina es de interés en este estudio; el umbral de la AUC de isatoribina para la observación de émesis y materias fecales sueltas es similar para la isatoribina administrada por vía intravenosa y la val-isatoribina administrada oralmente (Tabla 27).

[00323] Los datos en Tabla 27 indican que la val-isatoribina administrada oralmente proporciona un perfil mejorado de toxicidad sobre la isatoribina administrada oralmente, y son consistentes con la hipótesis de que el enmascaramiento químico de la actividad de isatoribina se produce sustituyendo químicamente un éster en la posición 5'-hidroxilo del nucleósido. Como se ilustra en Tablas 9 a 14, es posible enmascarar químicamente cualquier ligando TLR7 usando una variedad de sustituyentes. El diseño de esta sustitución para que sea escindible a la entrada en el cuerpo produce la exposición sistémica a la actividad útil del compuesto sin la toxicidad GI limitante, resultante de la estructura

anatómica del tracto GI. Como se ilustra en las Tablas 22 a 25, es posible diseñar la sustitución química en un ligando TLR7 enmascarado para que sea escindible después de la administración. Por consiguiente, profármacos de ligando TLR7 enmascarado pueden generarse para cualquier ligando TLR7. Esto permite la administración de dosis que son sustancialmente más altas sobre una base molar de las que, de otro modo, serían aceptables, con el resultado de una mayor eficacia y efectos colaterales reducidos, cuando se comparan con la administración del compuesto precursor "no enmascarado" solo.

6.6 Composición Oral

[00324] Tabla 28 ilustra una formulación en lotes y una formulación unitaria de dosis simple que contienen 100 mg de val-isatoribina.

Tabla 28: Formulación para una tableta de 100 mg

Material	Porcentaje en Peso	Cantidad (mg/tableta)	Cantidad (kg/lote)
val-isatoribina	40%	100.00	20.00
Celulosa Microcristalina , NF	53.5%	133.75	26.75
Surfactante F-68 Pluronic	4.0%	10.00	2.00
Croscarmelosa Sódica Tipo A, NF	2.0%	5.00	1.00
Estearato de Magnesio, NF	0.5%	1.25	0.25
Total	100.0%	250.00 mg	50.00 kg

[00325] Los componentes celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, y val-isatoribina se pasan a través de un tamiz de tamaño de malla #30 (alrededor de 430μ a alrededor de 655μ). El surfactante Pluronic F-68® (fabricado por JRH Biosciences, Inc. de Lenexa, KS) se pasó a través de un tamiz de tamaño de malla #20 (alrededor de 457μ a alrededor de

1041μ). El surfactante F-68® Pluronic y 0.5 kgs de croscarmelosa sódica se cargaron en un mezclador giratorio de doble casco de 16 qt. y se combinaron durante alrededor de 5 minutos. La mezcla se pasó luego a un mezclador giratorio de doble casco de 3 ft^3 en donde se agrega la celulosa microcristalina y se mezcla durante alrededor de 5 minutos. La talidomida se agrega y se mezcla durante 25 minutos más. Esta pre-mezcla se pasa por un compactador de rodillos con un molino de martillos unido a la descarga del compactador de rodillos y se regresa al mezclador giratorio. La croscarmelosa sódica restante y el estearato de magnesio se agregan al mezclador giratorio y se mezclan durante alrededor de 3 minutos. La mezcla final se comprime en una prensa rotatoria con 250 mg por tableta (tamaño de lote 200.000 tabletas).

6.7 Composición Mucosal

[00326] Se preparó un concentrado combinando isatoribina y una porción de 12.6 kg del tricloromonofluorometano en un recipiente sellado de acero inoxidable, equipado con un mezclador de alta cizalladura. El proceso de mezclado se lleva a cabo durante alrededor de 20 minutos. A continuación se prepara la suspensión gruesa en el recipiente sellado, combinando el concentrado con el resto de los propelentes en un tanque de producto a granel que se controla por temperatura entre 21° y27°C y presión controlada entre 2.8 a 4.0 BAR. Se diseñan envases aerosoles de 17 ml con una válvula dosificadora que entrega 100 inhalaciones de la composición de la invención. Cada envase se llena con los siguientes:

val-isatoribina	0.0120 g
tricloromonofluorometano	1.6960 g
diclorodifluorometano	3.7028g
diclorotetrafluoroetano	1.5 766 g
Total	7.0000 g

6.8 Composición Intravenosa

[00327] La formulación intravenosa se prepara reconstituyendo un compuesto de la invención con un medio líquido apropiado, tal como agua para inyección (WFI) o una solución de dextrosa al 5%. Una concentración deseada de la formulación intravenosa puede obtenerse reconstituyendo una cantidad apropiada de un compuesto de la invención con un volumen adecuado de medio líquido. Una concentración deseada de la formulación intravenosa proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención al paciente, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, necesitado de la formulación farmacéutica intravenosa y mantiene un nivel terapéuticamente efectivo de un compuesto de la invención en el paciente. La dosis que es terapéuticamente efectiva dependerá de la velocidad a la cual se entrega la formulación intravenosa al paciente y la concentración de la formulación intravenosa.

[00328] Por ejemplo, una ampolla que contiene una composición (por ejemplo, 50 mg de un compuesto de la invención por ampolla) se reconstituye con una solución de dextrosa al 5% (14 ml de solución de dextrosa al 5% por ampolla) proporcionando un total de 25 mL de solución. La solución reconstituida se incorpora en una solución de dextrosa en una bolsita de infusión y q.s. (cantidad suficiente) para 50 mL, resultando en una solución que contenía 1 mg/ml de un compuesto de la invención apta para administración de infusión intravenosa. La concentración preferida de un compuesto de la invención en el medio líquido, en la bolsita de infusión, es de alrededor de 0.001 a alrededor de 3 mg/ml, preferiblemente alrededor de 0.75 a alrededor de 1 mg/ml.

[00329] Lo anterior ha demostrado las características importantes y pertinentes de la presente invención. Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de la presente invención sin desviarse de su espíritu y ámbito, como será evidente a las personas de habilidad en el arte. Las incorporaciones específicas descritas aquí se ofrecen a modo de ejemplo únicamente, y la invención se limitará tan sólo por los términos de las reivindicaciones anexas junto con el ámbito completo de equivalentes a los cuales dichas reivindicaciones están autorizadas.

[00330] Todas las referencias citadas aquí se incorporan por referencia en su totalidad y para todos los efectos en la misma extensión como si cada publicación individual o patente o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para incorporarse por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

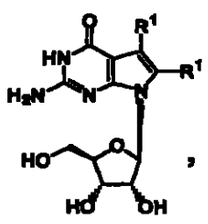
290

Lo que se reivindica es:

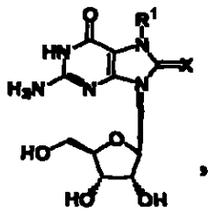
1. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar al paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable.

2. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar al paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, en donde el ligando TLR7 se selecciona de análogos y derivados de guanosina, imidazoquinolina, adenina, y pirimidina.

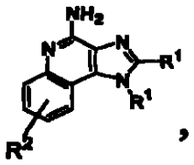
3. El método de la reivindicación 2 en donde el ligando TLR7 se selecciona de



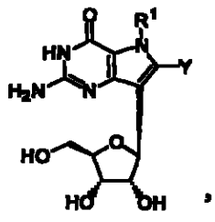
Ia



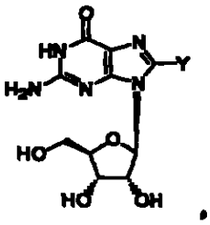
Ib



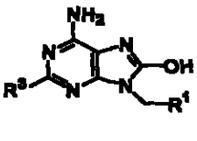
Ic



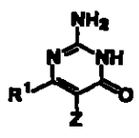
Id



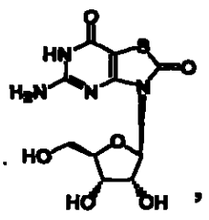
Ie



If



Ig



Ih

en donde:

cada R^1 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo;

R^2 es H, OH, SH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), arilo, o heteroarilo;

R^3 es H, OH, o SH, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -O-(alquilo), -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), -NH(alquilo), -NH(arilo), -NH(heteroarilo), -NH(R^4)(alquilo), -NH(R^4)(arilo), o -NH(R^4)(heteroarilo), en donde R^4 es un alquilo sustituido o no sustituido;

X es O ó S;

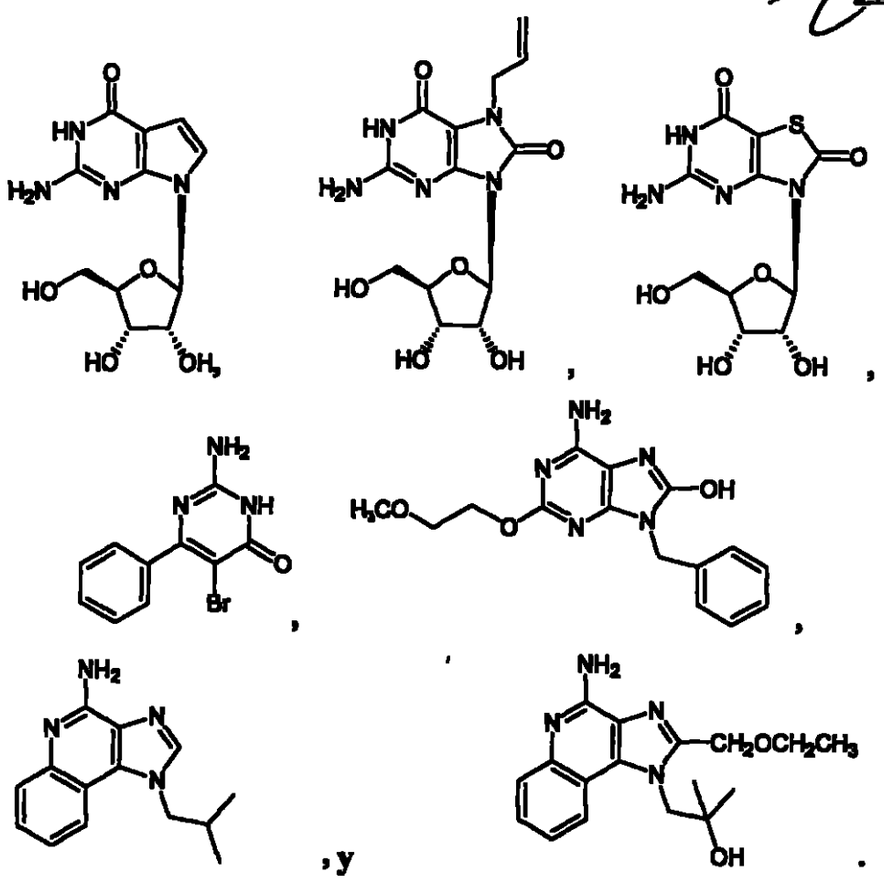
Y es H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, o un alquilo sustituido o no sustituido o arilo;

Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4;

o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

4. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se selecciona de Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, y Ih, en donde R^1 s H o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo; R^2 es H, OH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, o -CH_2-O-(alquilo); R^3 es H, OH, o SH, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -S- (alquilo), o -NH(alquilo); X es O ó S; Y es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4 ; y Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4.

5. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se selecciona de



, y

6. El método de la reivindicación 2, en donde el paciente es humano.

7. El método de la reivindicación 2, que comprende además administrar un excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. El método de la reivindicación 2, que comprende además administrar un agente terapéutico adicional.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el agente terapéutico adicional es un agente antivírico.

10. El método de la reivindicación 2, en donde la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva es 0.001 a 100 mg/kg al día.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la dosis terapéutica o

profilácticamente efectiva es alrededor de 0.01 a 50 mg/kg al día.

12. El método de la reivindicación 11, en donde la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva es alrededor de 0.1 a 20 mg/kg al día.

13. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se administra por vía parenteral.

14. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se administra por vía intravenosa.

15. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se administra por vía oral.

16. El método de la reivindicación 2, en donde el ligando TLR7 se administra por vía mucosal.

17. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar por vía oral al paciente, necesitado de ello, un profármaco de ligando TLR7 o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del ligando TLR7, reduciendo al mismo tiempo los efectos colaterales indeseables asociados con la administración oral de ligandos TLR7.

18. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar por vía oral al paciente, necesitado de ello, un profármaco de ligando TLR7 enmascarado o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del ligando TLR7, reduciendo al

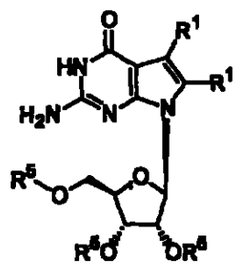
mismo tiempo los efectos colaterales indeseables asociados con la administración oral de los ligandos TLR7.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se selecciona de análogos y derivados de guanosina, imidazoquinolina, adenina, y pirimidina.

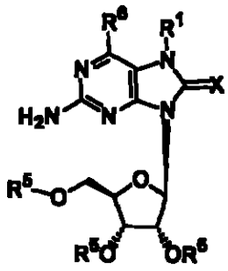
20. El método de la reivindicación 19, en donde el profármaco es (a) una fracción amida, carbamato, o amidina luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, carbonato, carbamato, éter, imidato, acetal, aminal, o cetal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de ligando TLR7, (c) una fracción acetal o cetal luego de la conversión de un sustituyente ceto de ligando TLR7, (d) una fracción imidato luego de la conversión de un carbonilo de ligando TLR7 de un sustituyente amido, (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un sustituyente oxo de ligando TLR7 pirimidina o guanosina, o (f) amina.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el profármaco se selecciona de (a) una fracción carbamato luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, éter, o aminal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de ligando TLR7, o (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un sustituyente oxo de ligando TLR7 de pirimidina o guanosina.

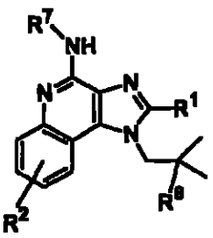
22. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco del ligando TLR7 enmascarado se selecciona de



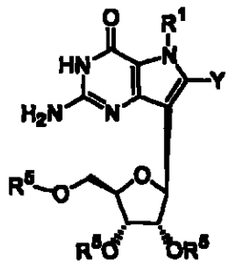
IIa ,



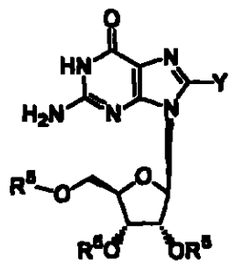
IIb ,



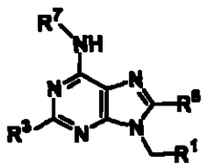
IIc ,



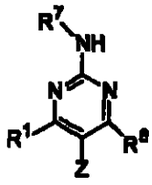
IId ,



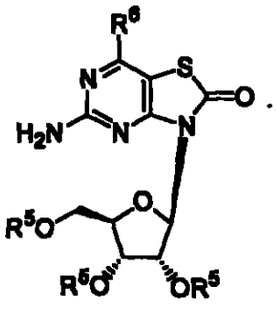
IIe ,



IIf ,



IIg ; y



IIh ,

en donde:

cada R^1 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo;

R^2 es H, OH, SH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), arilo, o heteroarilo;

R^3 es H, OH, o SH, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -O-(alquilo), -O-(arilo),-O-(heteroarilo), -S-

(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), -NH(alquilo), -NH(arilo), -NH(heteroarilo), -NH(R^4)(alquilo), -NH(R^4)(arilo), o -NH(R^4)(heteroarilo);

R^4 es un alquilo sustituido o no sustituido;

R^5 es independientemente H, -C(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido, L-, r D-, racémico -C(O)CHNH_2R^9;

R^6 es H, OR^{10}, ó N(R^{11})$_2$;

R^7 es independientemente H o un -C(O)(C1-18alquilo) sustituido o no sustituido o -C(O)$_2$(C_{1-18}alquilo);

R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), -OCO$_2$(C_{1-18}alquilo), -OC(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -OC(O)CHNH_2R^1;

R^9 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, C(O)CH(C_{1-6}alquil)NH_2, o -C(O)CH(CH_2-aril)NH_2;

R^{10} es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_{3-7}alquenilo, C_{3-7} alquinilo, -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_6-C_{10} arilo),

-($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_3-C_{10} cicloalquilo), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_4-C_{10} heterocíclico), -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>1}$OH, -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$$CO_2C_{1-18}$ alquilo, y -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$N(R^{14})CO_2C_{1-18} alquilo, y SO_2(arilo),

en donde t es un entero que va de 0 a 6, a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, -NH_2, -NH-alquilo, -N(alquil)$_2$, -NH-arilo, -N(alquil)(arilo), -N(aril)$_2$, -NHCHO, -NHC(O)alquilo, -NHC(O)arilo, -N(alquil)C(O)H, -N(alquil)C(O)alquilo, -N(aril)C(O)H, -N(aril)C(O)alquilo, -NHCO$_2$alquilo, -N(alquil)CO$_2$alquilo, -NHC(O)NH_2, -N(alquil)C(O)NH_2, -NHC(O)NH-alquilo, -NHC(O) N(alquil)$_2$, -N(alquil)C(O)NH-alquilo, N(alquil)C(O) N(alquil)$_2$, -NHSO$_2$-alquilo, -N(alquil)SO$_2$-alquilo, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)arilo, -CO$_2$-alquilo, -CO$_2$-arilo, -CO$_2$H, -C(O)NH_2, -C(O)NH-alquilo, -C(O)N(alquil)$_2$, -C(O)NH-arilo, -C(O)N(aril)$_2$, -C(O)N(alquil)(arilo), -S(O)alquilo, -S(O)arilo, -SO$_2$alquilo, -SO$_2$arilo, -

SO_2NH_2, -SO_2NH-alquilo, y -SO_2N(alquil)$_2$;

R^{11} es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_3-C_{10}cicloalquilo, o conjuntamente con nitrógeno forma un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros;

R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, C_{2-6} alquenilo, o C_{2-6} alquinilo;

R^{14} es H, C_{1-6} alquilo, o -CH_2-arilo;

X es O ó S;

Y es H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, NH_2, NHR^4, $N(R^4)_2$, o un alquilo sustituido o no sustituido o arilo; y

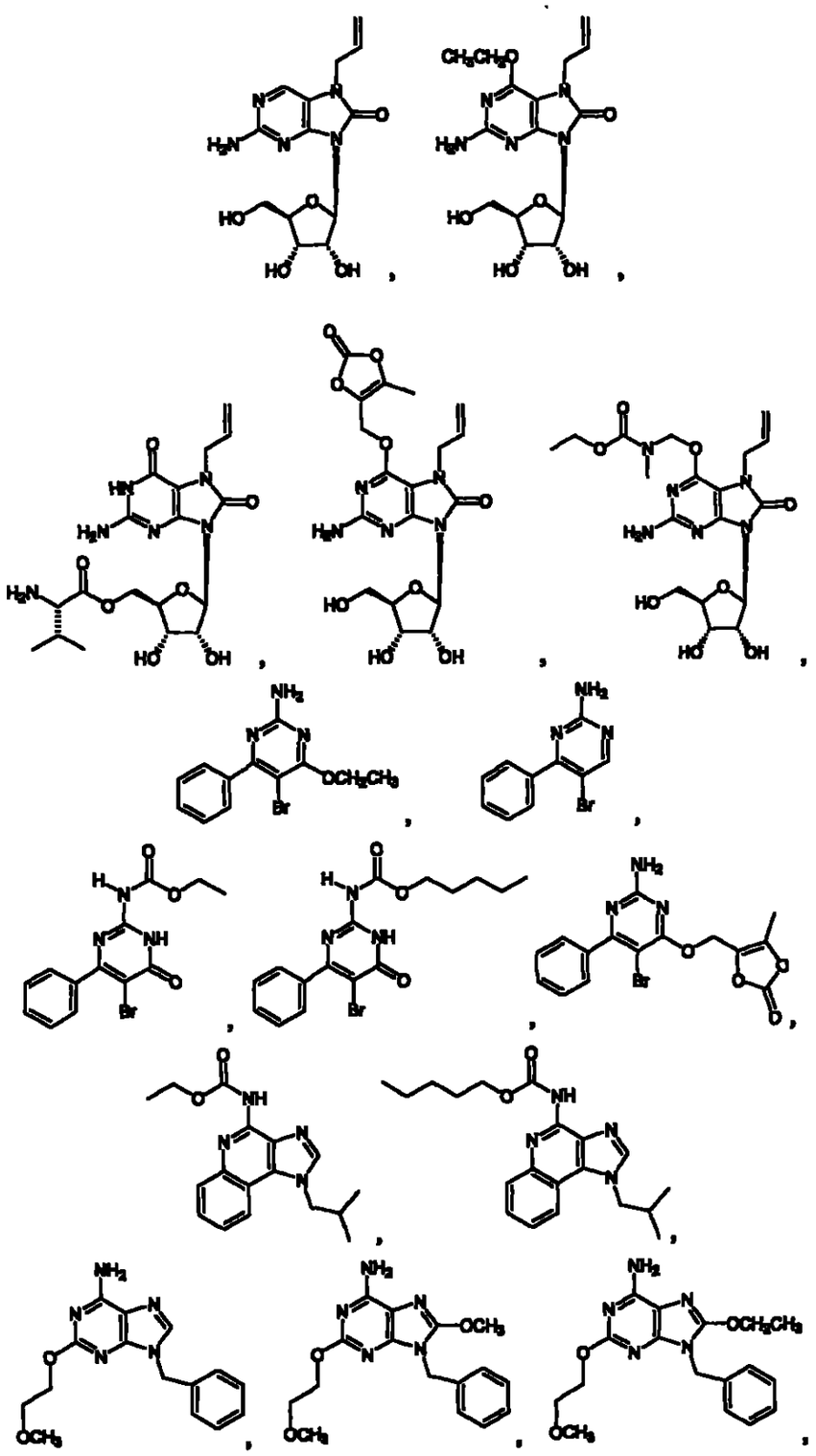
Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4;

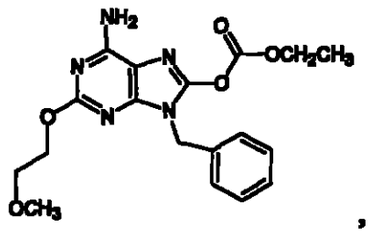
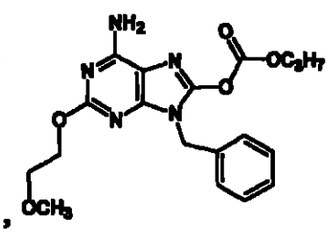
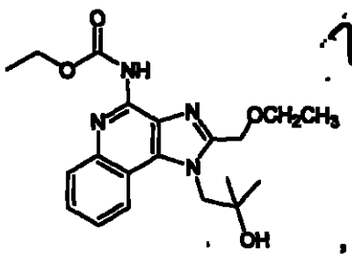
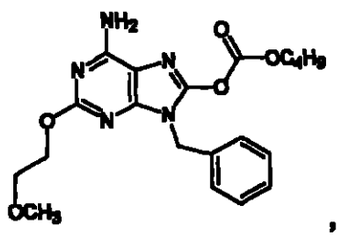
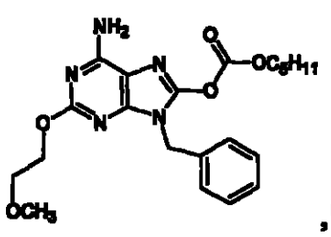
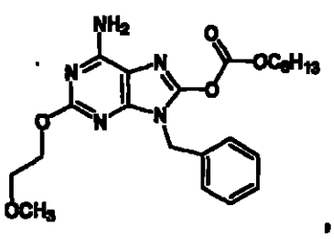
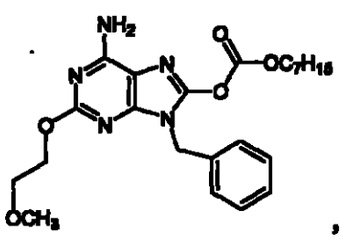
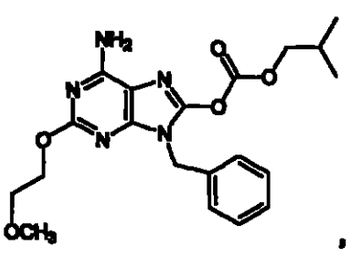
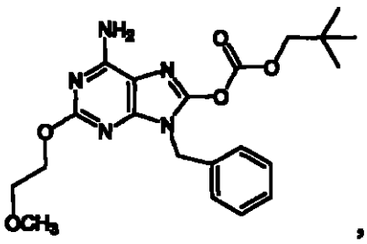
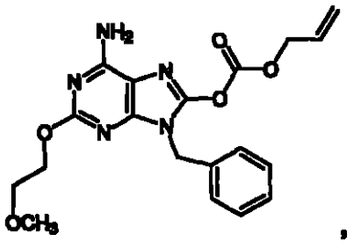
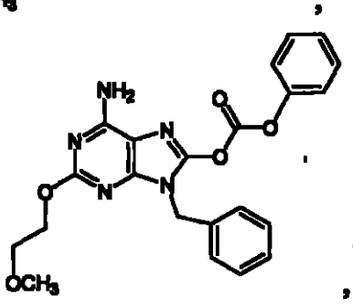
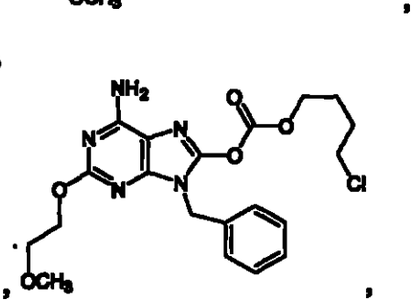
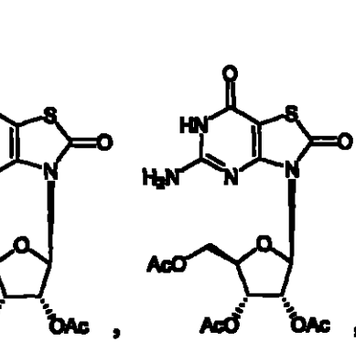
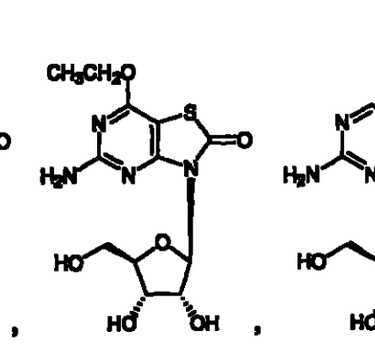
o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

23. El método de la reivindicación 22, en donde R^1 es H o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo; R^2 es H, OH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, o -CH_2-O-(alquilo); R^3 es H, OH, o SH, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -S-(alquilo), o -NH(alquilo); R^5 es independientemente H, -C(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -C(O)CHNH_2R^9, en donde R^9 es un alquilo no sustituido; R^6 es H ó OR^{10}, en donde R^{10} es independientemente C_{1-6} alquilo, C_{3-7} alquenilo, C_{3-7} alquinilo, -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_6-C_{10} arilo), -$(CR^{12}R^{13})_t$(C_4-C_{10} heterocíclico), y -$(CR^{12}R^{13})_{t>0}$N(R^{14})CO_2C_{1-18} alquilo, en donde t es un entero que va de 0 a 4, a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo, alquenilo, arilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, -CO_2-alquilo, -CO_2-arilo, -OC(O)alquilo, y -OC(O)arilo, y en donde R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, o C_{2-6} alquenilo; y R^{14} es H, -CH_3, o -CH_2CH_3; R^7 es independientemente H o un -C(O)(C1-18alquilo) sustituido o no sustituido

o $-C(O)_2(C_{1-18}alquilo)$; R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), $-OCO_2(C_{1-18}alquilo)$, o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico $-OC(O)CHNH_2R^1$; X es O ó S; Y es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4; y Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4.

24. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se selecciona de



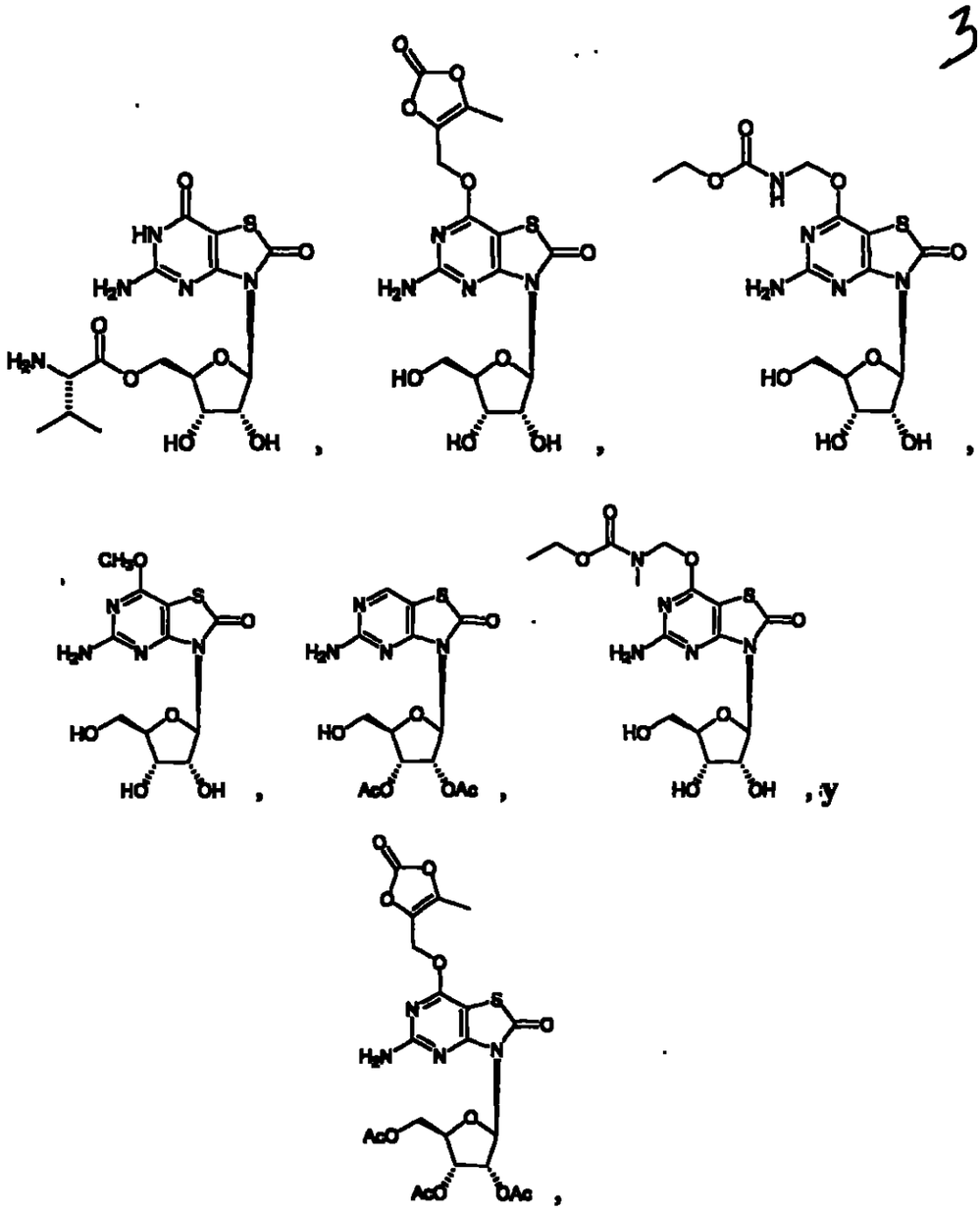

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



25. El método de la reivindicación 18, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 10% a 500% de la exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de administración oral del ligando TLR7 solo.

26. El método de la reivindicación 18, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 50% a 200% de la

exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de administración oral del ligando TLR7 solo. 301

27. El método de la reivindicación 25, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del correspondiente ligando TLR7 sin causar irritación gastrointestinal.

28. El método de la reivindicación 18, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado reduce los efectos colaterales indeseables en un paciente, en relación con los efectos colaterales luego de la administración oral del ligando TLR7 solo.

29. El método de la reivindicación 18, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado reduce los efectos colaterales indeseables en un 50% en un paciente, en relación con los efectos colaterales luego de la administración oral del ligando TLR7 solo.

30. El método de la reivindicación 18, en donde el efecto colateral es irritabilidad gastrointestinal.

31. El método de la reivindicación 30, en donde irritabilidad es hemorragia.

32. El método de la reivindicación 30, en donde irritabilidad son lesiones.

33. El método de la reivindicación 30, en donde irritabilidad es émesis.

34. El método de la reivindicación 18, en donde el paciente es humano.

35. El método de la reivindicación 18, que comprende además

administrar un excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

36. El método de la reivindicación 18, que comprende además administrar un agente terapéutico adicional.

37. El método de la reivindicación 36, en donde el agente terapéutico adicional es un agente antivírico.

38. El método de la reivindicación 18, en donde la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva es 0.001 a 100mg/kg al día.

39. El método de la reivindicación 38, en donde la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva es alrededor de 0.1 a 25 mg/kg al día.

40. El método de la reivindicación 39, en donde la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva es alrededor de 1 a 20 mg/kg al día.

41. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía parenteral.

42. El método de la reivindicación 41, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía intravenosa.

43. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía oral.

44. El método de la reivindicación 18, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía mucosal.

45. Un método para tratar enfermedades sensibles a inmunoterapia, reduciendo al mismo tiempo efectos colaterales indeseables asociados con

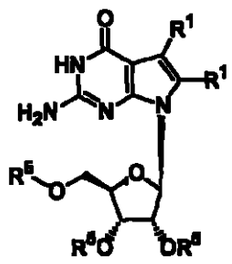
agentes inmunitarios, que comprende administrar por vía oral un profármaco de ligando TLR7 a un paciente necesitado de inmunoterapia, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva de un ligando TLR7 en el paciente.

46. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se selecciona de análogos y derivados de guanosina, imidazoquinolina, adenina, y pirimidina.

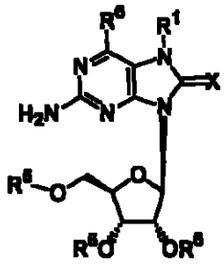
47. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco es (a) una fracción amida, carbamato, o amidina luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, carbonato, carbamato, éter, imidato, acetal, aminal, o cetal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de ligando TLR7, (c) una fracción acetal o cetal luego de la conversión de un sustituyente ceto de ligando TLR7, (d) una fracción imidato luego de la conversión de un carbonilo de ligando TLR7 de un sustituyente amido, (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un sustituyente oxo de ligando TLR7 de pirimidina o guanosina, o (f) amina.

48. El método de la reivindicación 47, en donde el profármaco se selecciona de (a) una fracción carbamato luego de la conversión de un sustituyente amina de ligando TLR7, (b) una fracción éster, éter, o aminal luego de la conversión de un sustituyente alcohol de ligando TLR7, o (e) una fracción desoxigenada luego de la conversión de un oxo sustituyente de ligando TLR7 de pirimidina o guanosina.

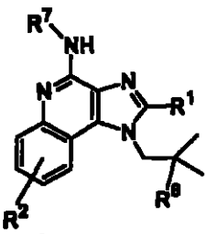
49. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se selecciona de



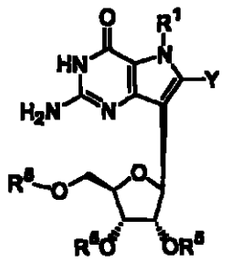
IIa ,



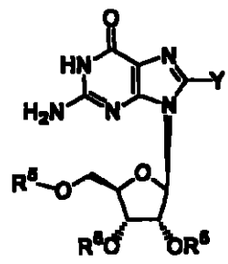
IIb ,



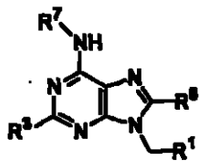
IIc ,



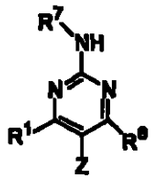
IId ,



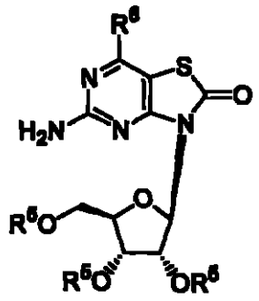
IIe ,



IIf ,



IIg ; y



IIh ,

en donde:

cada R^1 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, ó N, o un arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo;

R^2 es H, OH, SH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, los cuales pueden interrumpirse por uno o más heteroátomos O, S, o N, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -O-(arilo), -O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), arilo, o heteroarilo;

R^3 es H, OH, o SH, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, -O-(alquilo), -O-(arilo),-O-(heteroarilo), -S-(alquilo), -S-(arilo), -S-(heteroarilo), -NH(alquilo), -NH(arilo), -

NH(heteroarilo), -NH(R^4)(alquilo), -NH(R^4)(arilo), o -NH(R^4)(heteroarilo);

R^4 es un alquilo sustituido o no sustituido;

R^5 es independientemente H, -C(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -C(O)CHNH_2R^9;

R^6 es H, OR^{10}, ó N(R^{11})$_2$;

R^7 es independientemente H o un -C(O)(C1-18alquilo) sustituido o no sustituido o -$C(O)_2$(C_{1-18}alquilo);

R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), -OCO_2(C_{1-18}alquilo), -OC(O)(C_{1-18}alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico -OC(O)CHNH_2R^1;

R^9 es H, o un alquilo sustituido o no sustituido, C(O)CH(C_{1-6}alquil)NH_2, o -C(O)CH(CH_2-aril)NH_2;

R^{10} es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_{3-7}alquenilo, C_{3-7} alquinilo, -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_6-C_{10} arilo), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_3-C_{10} cicloalquilo), -($CR^{12}R^{13}$)$_t$(C_4-C_{10} heterocíclico), -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>1}$OH, -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$$CO_2C_{1-18}$ alquilo, y -($CR^{12}R^{13}$)$_{t>0}$N(R^{14})CO_2C_{1-18} alquilo, y SO_2(arilo), en donde t es un entero que va de 0 a 6, a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6alquilo, C_2-C_6alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, -NH_2, -NH-alquilo, -N(alquilo)$_2$, -NH-arilo, -N(alquil)(arilo), -N(arilo)$_2$, -NHCHO, -NHC(O)alquilo, -NHC(O)arilo, -N(alquil)C(O)H, -N(alquil)C(O)alquilo, -N(aril)C(O)H, -N(aril)C(O)alquilo, -$NHCO_2$alquilo, -N(alquil)CO_2alquilo, -NHC(O)NH_2, -N(alquil)C(O)NH_2, -NHC(O)NH-alquilo, -NHC(O) N(alquilo)$_2$, -N(alquil)C(O)NH-alquilo, N(alquil)C(O) N(alquilo)$_2$, -$NHSO_2$-alquilo, -N(alquil)SO_2-alquilo, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)arilo, -CO_2-alquilo, -CO_2-arilo, -CO_2H, -$C(O)NH_2$, -C(O)NH-alquilo, -C(O)N(alquilo)$_2$, -C(O)NH-arilo, -C(O)N(arilo)$_2$, -C(O)N(alquil)(arilo), -S(O)alquilo, -S(O)arilo, -SO_2alquilo, -SO_2arilo, -SO_2NH_2, -SO_2NH-alquilo, y -SO_2N(alquilo)$_2$;

R^{11} es independientemente H, C_{1-6} alquilo, C_3-C_{10}cicloalquilo, o

conjuntamente con nitrógeno forma un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros;

R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, C_{2-6} alquenilo, o C_{2-6} alquinilo;

R^{14} es H, C_{1-6} alquilo, o $-CH_2$-arilo;

X es O ó S;

Y es H, halo, OH, OR^4, SH, SR^4, NH_2, NHR^4, $N(R^4)_2$, o un alquilo sustituido o no sustituido o arilo; y

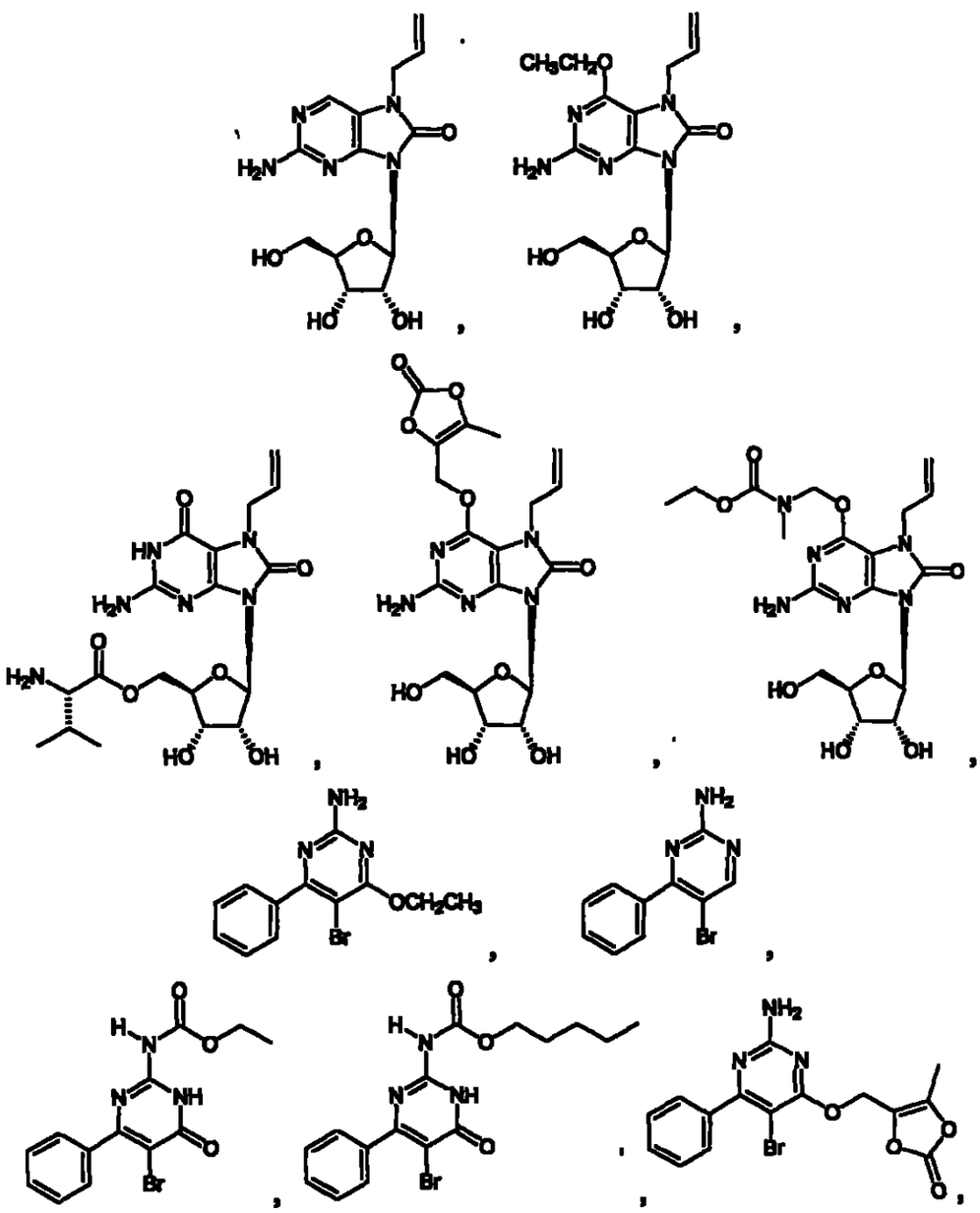
Z es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4;

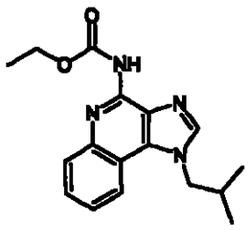
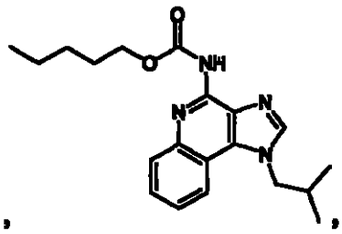
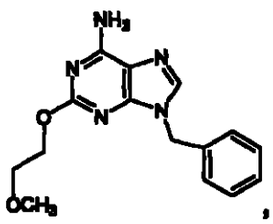
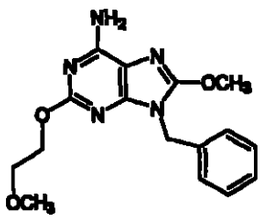
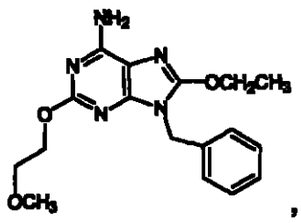
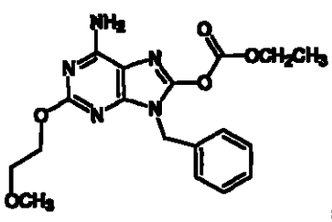
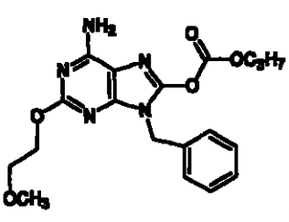
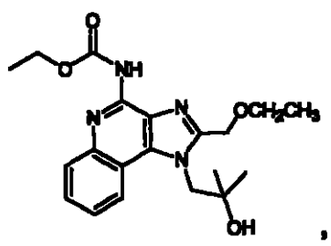
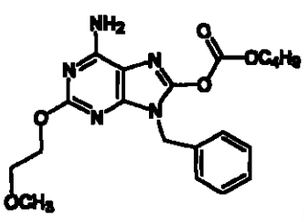
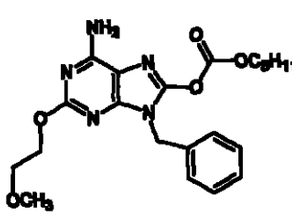
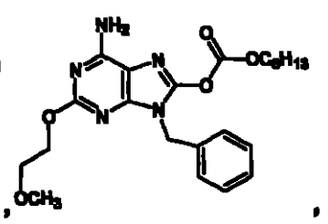
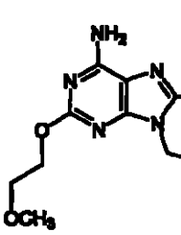
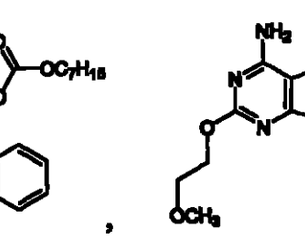
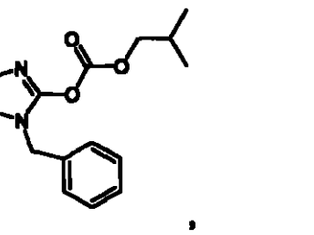
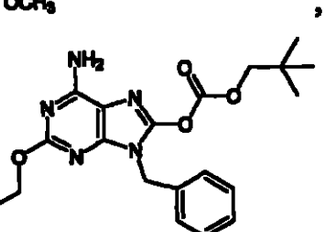
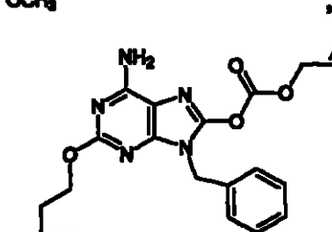
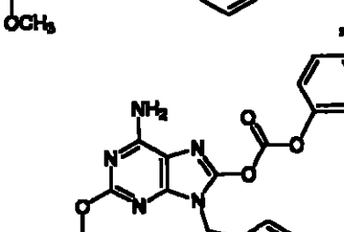
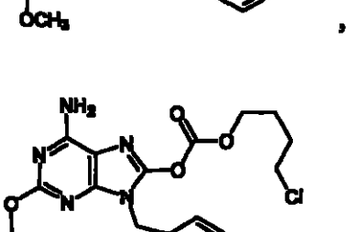
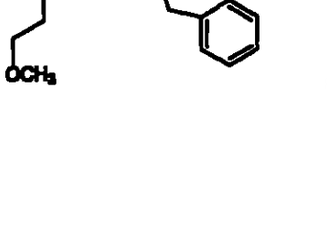
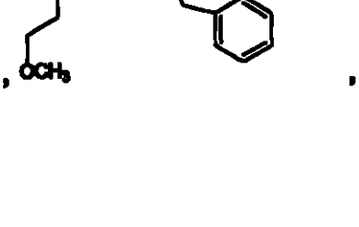
o su sal, hidrato, metabolito o estereoisómero farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho estereoisómero.

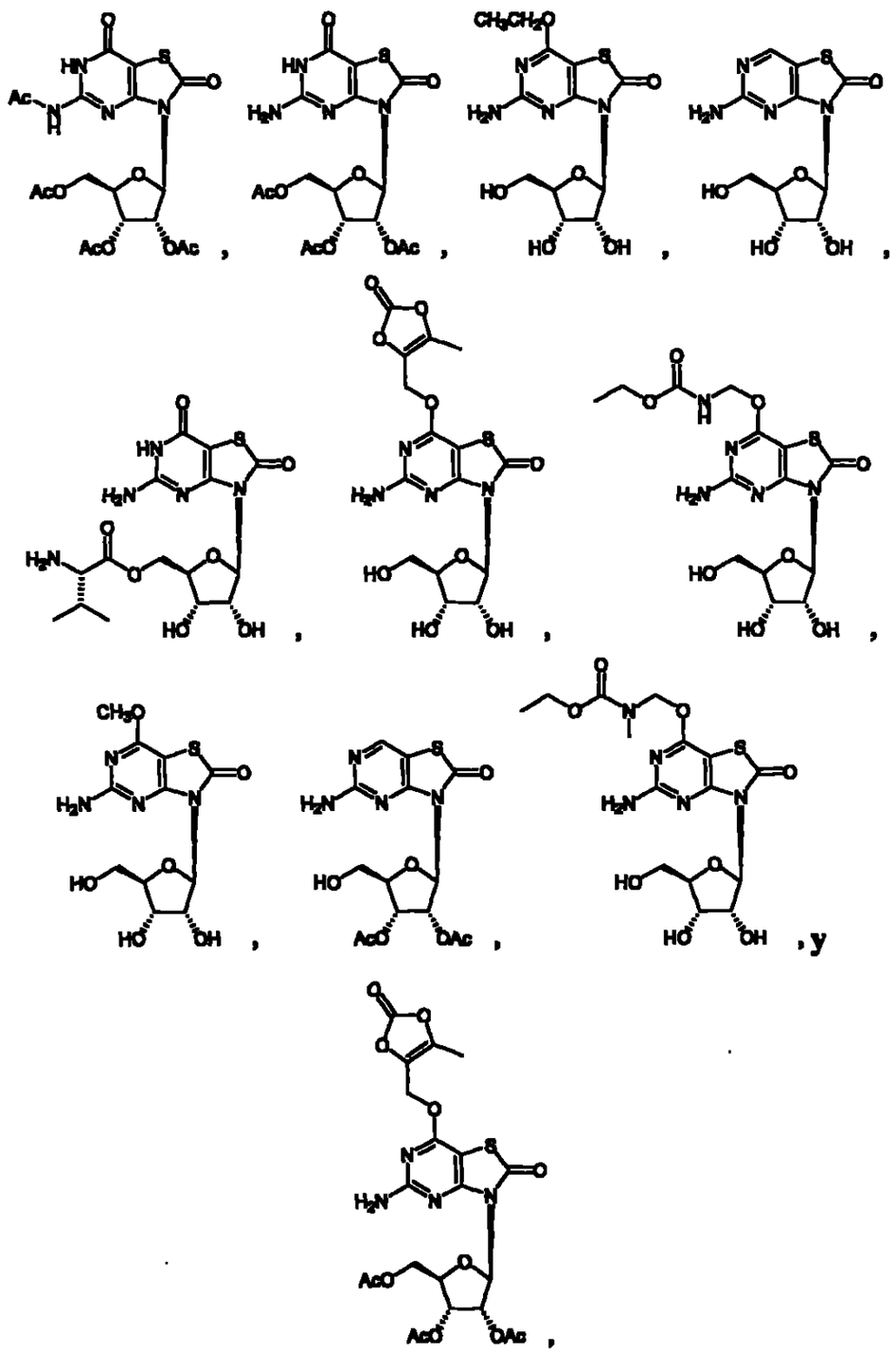
50. El método de la reivindicación 49, en donde R^1 es H o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo; R^2 es H, OH, halo, o un alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, o alquinilo, ó $-CH_2$-O-(alquilo); R^3 es H, OH, ó SH, o un -O-(alquilo) sustituido o no sustituido, -S-(alquilo), o -NH(alquilo); R^5 es independientemente H, $-C(O)(C_{1-18}$alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico $-C(O)CHNH_2R^9$, en donde R^9 es un alquilo no sustituido; R^6 es H ó OR^{10}, en donde R^{10} es independientemente C_{1-6} alquilo, C_{3-7} alquenilo, C_{3-7} alquinilo, $-(CR^{12}R^{13})_t(C_6$-C_{10} arilo), $-(CR^{12}R^{13})_t(C_4$-C_{10} heterocíclico), y $-(CR^{12}R^{13})_{t>0}N(R^{14})CO_2C_{1-18}$ alquilo, en donde t es un entero que va de 0 a 4, a menos que se indique lo contrario, y en donde las fracciones alquilo, alquenilo, arilo, y heterocíclico de los grupos precedentes se sustituyen de manera opcional con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, hidroxi, C_1-C_6 alcoxi, $-CO_2$-alquilo, $-CO_2$-arilo, -OC(O)alquilo, y -OC(O)arilo, y en donde R^{12} y R^{13} son independientemente H, C_{1-6} alquilo, o C_{2-6} alquenilo; y R^{14} es H, $-CH_3$, ó $-CH_2CH_3$; R^7 es independientemente H o un -C(O)(C1-18alquilo) sustituido o no sustituido ó $-C(O)_2(C_{1-18}$alquilo); R^8 es H, -OH, -O-(alquilo), $-OCO_2(C_{1-18}$alquilo), o un grupo aminoácido L-, o D-, racémico $-OC(O)CHNH_2R^1$; X es O ó S; Y es H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4; y Z es

H, halo, OH, OR^4, SH, ó SR^4.

51. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se selecciona de




,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



52. El método de la reivindicación 45, en donde la enfermedad es una infección vírica.

53. El método de la reivindicación 52, en donde la infección vírica selecciona de un virus ADN o ARN, incluidos adenovirus, citomegalovirus,

virus de la hepatitis A (HAV), hepadnavirus incluido el virus de la hepatitis B (HBV), flavivirus incluido el virus de la fiebre amarilla, hepacivirus incluido el virus de la hepatitis C (HCV), herpes simplex tipo 1 y *2*, herpes zoster, herpesvirus 6 humano, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de papiloma humano (HPV), virus de la influenza A, virus de la influenza B, sarampión, virus de la parainfluenza, pestivirus, poliovirus, poxvirus (incluido el virus de la viruela y de la viruela de los monos), rinovirus, coronovirus, virus respiratorio sincitial (RSV), múltiples familias de virus que causan fiebres hemorrágicas, incluidos los Arenavirus, los virus Bunya y Filovirus, y una gama de encefalitis víricas causadas por virus de ADN y ARN.

54. El método de la reivindicación 45, en donde la enfermedad es un cáncer.

55. El método de la reivindicación 45, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 10% a 500% de la exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de administración oral del ligando TLR7 solo.

56. El método de la reivindicación 55, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática efectiva *in vivo* del ligando TLR7 que es 50% a 200% de la exposición efectiva *in vivo* obtenida luego de administración oral del ligando TLR7 solo.

57. El método de la reivindicación 56, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado logra una concentración plasmática terapéuticamente efectiva del correspondiente ligando TLR7 sin causar irritación gastrointestinal.

58. El método de la reivindicación 45, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado reduce los efectos colaterales indeseables en un paciente, en relación con los efectos colaterales luego de la administración oral del ligando TLR7 solo.

59. El método de la reivindicación 45, en donde la administración oral del profármaco de ligando TLR7 enmascarado reduce los efectos colaterales indeseables en un 50% en un paciente, en relación con los efectos colaterales luego de la administración oral del ligando TLR7 solo.

60. El método de la reivindicación 45, en donde el efecto colateral es irritabilidad gastrointestinal.

61. El método de la reivindicación 60, en donde la irritabilidad es hemorragia.

62. El método de la reivindicación 60, en donde la irritabilidad son lesiones.

63. El método de la reivindicación 60, en donde la irritabilidad es émesis.

64. El método de la reivindicación 45, en donde el paciente es humano.

65. El método de la reivindicación 45, que comprende además administrar un excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

66. El método de la reivindicación 45, que comprende además administrar un agente terapéutico adicional.

67. El método de la reivindicación 66, en donde el agente terapéutico

adicional es un agente antivírico.

68. El método de la reivindicación 45, en donde la dosis terapéutica o profiláctica mente efectiva es 0.001 a 100mg/kg al día.

69. El método de la reivindicación 68, en donde la dosis terapéutica o profiláctica mente efectiva es alrededor de 0.01 a 50 mg/kg al día.

70. El método de la reivindicación 69, en donde la dosis terapéutica o profiláctica mente efectiva es alrededor de 0.1 a 20 mg/kg al día.

71. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía parenteral.

72. El método de la reivindicación 71, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía intravenosa.

73. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía oral.

74. El método de la reivindicación 45, en donde el profármaco de ligando TLR7 enmascarado se administra por vía mucosal.

347 3.1.3

EXTRACTO DE LA INVENCIÓN

[00331] Esta invención se refiere a métodos para tratar o prevenir infecciones por el virus de la hepatitis C en mamíferos usando ligandos de Receptor Tipo Peaje (TLR) 7 y sus profármacos. Más particularmente, esta invención se relaciona con métodos de administrar por vía oral una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más profármacos de ligando TLR7 para el tratamiento o prevención de infección vírica por hepatitis C. La administración oral de estos ligandos inmunomoduladores de TLR7 y sus profármacos a un mamífero provee cantidades terapéuticamente efectivas y reducidos efectos colaterales indeseables.

3:14

FIG. 1

Respuesta de Interferón α Murino

Isatoribina 25 mg/kg I.v. vs Val-Isatoribina 50 mg/kg p.o.

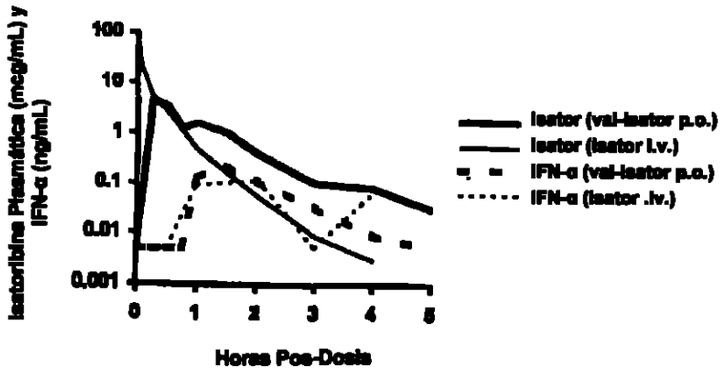
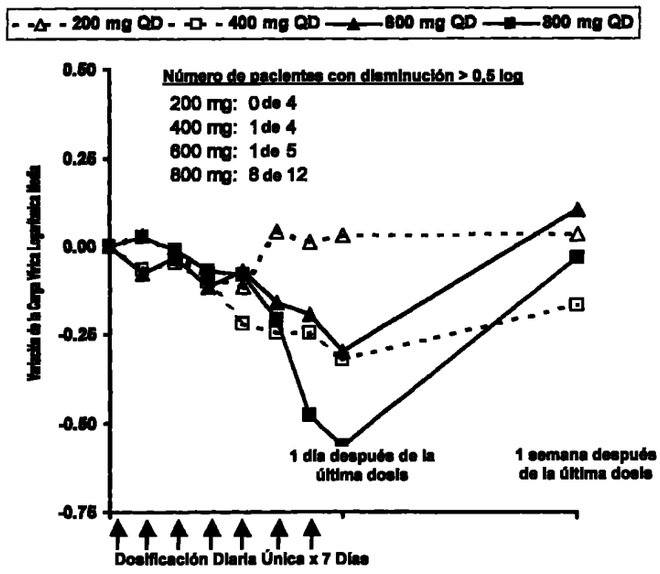


Figura 2



WO 2005/025583
2/2
PCT/US2004/029236

320
316

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
22222-24-WO1		
International application No.	International filing date (day/month/year)	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
PCT/US2004/028236	01/09/2004	05/09/2003
Applicant		
AMADYS PHARMACEUTICALS, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 09 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      [ ] The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. [X] Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant.
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   TLR7 LIGANDS FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C

5. With regard to the abstract,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant.
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract.

324
3:17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/028236

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 2,17-21,25-33,45-48,52-74
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-44

Methods of treating hepatitis C infections using TLR7 ligands.

2. claims: 45-74

Methods of treating diseases responsive to immunotherapy using "masked TLR7 ligand prodrugs".

323
3:19

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2,17-21,25-33,45-48,52-74

Present claims 2, 17-21, 25-33, 45-48 and 52-74 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely

"a (masked) TLR7 ligand prodrug" (claims 17-21, 45-48, 52-74);
"wherein the oral administration of the TLR7 ligand prodrug ... administration of TLR7 ligands" (claims 17, 18);
"analogs and derivatives of guanosine, imidazoquinoline, adenine, and pyrimidine" (claims 2, 19, 46);
" after conversion of a TLR7 ligand amine/alcohol/keto/amido/oxo substituent" (claims 20-21, 47-48);

"wherein the oral administration ... upon oral administration of the TLR7 ligand alone" (claims 25-33, 55-74);

"diseases responsive to immunotherapy" (claims 45-48);

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Art. 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Art. 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Art. 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Claims 22, 47 are unclear in as far as metabolites of the disclosed compounds are concerned. This feature has not been searched.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products as disclosed in the claims 3-5, 22-24 and 49-51 (excluding "metabolites thereof") .

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

overcome.

3.2 J

3.2.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/708 A61P31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RANEY. A.K.; HAMATAKE, R.K.; HONG, Z.: "HEP DART 2003: Frontiers in drug development for viral hepatitis" EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, vol. 13, no. 3, 2004, pages 289-293, XP001203944 page 291, column 1, line 7 - line 24	1-44
P,X	MEALY, N.E.: "Isatoribine" DRUGS OF THE FUTURE, vol. 29, no. 5, 2004, page 526, XP009040479 See "Isatoribine", especially footnote 1	1-44

-/—

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 February 2005	14.03.2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Taylor, G.M.

346

322

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028236

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MEALY, N.E.: "ANA-971" DRUGS OF THE FUTURE, vol. 29, no. 5, 2004, page 507, XP009040480 See "ANA-971", especially footnote 1	1-44
X	US 5 041 426 A (ROBINS ROLAND K ET AL) 20 August 1991 (1991-08-20) abstract column 4, line 41 - line 46 column 5, line 13 - line 15 examples 1-59 claims 1-23	1-74
X	WO 03/045968 A (ANADYS PHARMACEUTICALS INC) 5 June 2003 (2003-06-05) cited in the application abstract page 1, line 9 - line 14 page 3, line 12 - page 6, line 20 page 39, line 20 - page 48, line 19 claims 1-11	1-74
X	US 4 880 784 A (ROBINS ROLAND K ET AL) 14 November 1989 (1989-11-14) cited in the application abstract column 3, line 45 - line 48 column 4, line 12 - line 16 examples 1-43 claims 10,16	1-44
A	MICHAEL, M.A. ET AL.: "Alkylpurines as Immunepotentiating Agents: Synthesis and Antiviral Activity of Certain Alkylguanines" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 36, no. 22, 1993, pages 3431-3436, XP002307482 cited in the application abstract page 3431, column 2 table I	1-44

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028236

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, J. ET AL: "Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 11, 27 May 2003 (2003-05-27), pages 6646-6651, XP002307483 abstract figure 1 page 6649, column 1 figure 6 table 1	1-44
X	REITZ, A.B. ET AL.: "Small-Molecule Immunostimulants. Synthesis and Activity of 7,8-Disubstituted Guanosines and Structurally Related Compounds" J. MED. CHEM., vol. 37, no. 21, 1994, pages 3561-3578, XP002316151 cited in the application abstract tables 1-5 figure 1 page 3569, "Conclusions"	45-74
A	RHODES, J.: "Discovery of immunopotentiatory drugs: current and future strategies" CLIN. EXP. IMMUNOL., vol. 130, 2002, pages 363-369, XP002316152 abstract Introduction page 365, column 1, line 27 - line 33 page 367 - page 368	45-74

3256

3:24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/028236

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5041426	A	20-08-1991	US	4880784 A	14-11-1989
			AR	246104 A1	30-03-1994
			AT	126060 T	15-08-1995
			AT	173929 T	15-12-1998
			CA	1319931 C	06-07-1993
			DE	3854297 D1	14-09-1995
			DE	3854297 T2	28-03-1996
			DE	3856279 D1	14-01-1999
			DE	3856279 T2	20-05-1999
			DK	406389 A	04-10-1989
			EP	0348446 A1	03-01-1990
			EP	0636372 A1	01-02-1995
			ES	2010786 A6	01-12-1989
			JP	2590248 B2	12-03-1997
			JP	3504122 T	12-09-1991
			KR	9702611 B1	06-03-1997
			WO	8905649 A1	29-06-1989
			AU	2486088 A	19-07-1989
			NO	893343 A	23-10-1989
WO 03045968	A	05-06-2003	AU	2002365412 A1	10-06-2003
			BR	0214407 A	19-10-2004
			CA	2468552 A1	05-06-2003
			EP	1451203 A1	01-09-2004
			HR	20040541 A2	31-10-2004
			WO	03045968 A1	05-06-2003
			US	2003151560 A1	14-08-2003
			US	2003199461 A1	23-10-2003
US 4880784	A	14-11-1989	AR	246104 A1	30-03-1994
			AT	126060 T	15-08-1995
			AT	173929 T	15-12-1998
			AU	2486088 A	19-07-1989
			CA	1319931 C	06-07-1993
			DE	3854297 D1	14-09-1995
			DE	3854297 T2	28-03-1996
			DE	3856279 D1	14-01-1999
			DE	3856279 T2	20-05-1999
			DK	406389 A	04-10-1989
			EP	0348446 A1	03-01-1990
			EP	0636372 A1	01-02-1995
			ES	2010786 A6	01-12-1989
			JP	2590248 B2	12-03-1997
			JP	3504122 T	12-09-1991
			KR	9702611 B1	06-03-1997
			NO	893343 A	23-10-1989
			WO	8905649 A1	29-06-1989
			US	5041426 A	20-08-1991

22222/00044 WO 1
MJP

3.25
3.25

M

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

MARK J. PINO
CONNOLLY BOVE LODGE & HUTZ LLP
1990 M STREET, N.W., SUITE 800
WASHINGTON, DISTRICT OF COLUMBIA
20036-3425

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing *(day/month/year)*	08 JUN 2005
Applicant's or agent's file reference: 22222-24-WO1	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2004/028236	01 Sep 2004	05 Sep 2003

Applicant: ANAYDS PHARMACEUTICALS, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

   01 April 2005

2. That date of receipt is:

   [X] the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).

   [ ] the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).

   [ ] the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. [ ] ATTENTION: That date of receipt is after the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, in respect of some Offices, the demand does not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) and the acts for entry into the national phase must therefore be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices). However, in respect of some other Offices, the time limit of 30 months (or later) may nevertheless apply. See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

   [ ] *(If applicable)* This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Sonya Barnes
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-308-9290 129

Form PCT/IPEA/409 (April 2002- rewrint January 2004)

320
326

22222/00224 WO 1
MJP

PATENT COOPERATION TREA

PCT/US04/028236

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

PINO, Mark, J.
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W., Suite 800
Washington, DC 20036-3425
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 12 April 2005 (12.04.2005)	
Applicant's or agent's file reference 22222-24-WO1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/028236	International filing date *(day/month/year)* 01 September 2004 (01.09.2004)
International publication date *(day/month/year)* 24 March 2005 (24.03.2005)	Priority date *(day/month/year)* 05 September 2003 (05.09.2003)
Applicant ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letter "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 September 2003 (05.09.2003)	60/500,339	US	08 October 2004 (08.10.2004)
10 November 2003 (10.11.2003)	60/518,898	US	04 October 2004 (04.10.2004)
10 November 2003 (10.11.2003)	60/518,997	US	11 October 2004 (11.10.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Authorized officer

Lindner Nora

Facsimile No. +41 22 338 89 65
Telephone No. +41 22 338 9720

327
3.27

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/US2004/028238	01.09.2004	05.09.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K31/706, A61P31/14

Applicant
ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Taylor, G.M.

Telephone No. +49 89 2399-8408

328
328

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/028236

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☐ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☐ in written format

      ☐ in computer readable form

   c. time of filing/furnishing:

      ☐ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in computer readable form.

      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

333

329

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/028236

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-74

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-74 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 17-21,45-48,52-74 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

see separate sheet

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard
the computer readable form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/028236

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has:

   ☐ paid additional fees.

   ☐ paid additional fees under protest.

   ☐ not paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☒ all parts.

   ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-74
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-74
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-74

2. Citations and explanations

see separate sheet

324/331

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/026236

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

   and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

   see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No. PCT/US2004/028236

The following documents are cited:

D1: RANEY. A.K.; HAMATAKE, R.K.; HONG, Z.: "HEP DART 2003: Frontiers in drug development for viral hepatitis" EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, vol. 13, no. 3, 2004, pages 289-293, XP001203944

D2: MEALY, N.E.: "Isatoribine" DRUGS OF THE FUTURE, vol. 29, no. 5, 2004, page 526, XP009040479

D3: MEALY, N.E.: "ANA-971" DRUGS OF THE FUTURE, vol. 29, no. 5, 2004, page 507, XP009040480

D4: US-A-5 041 426 (ROBINS ROLAND K ET AL) 20 August 1991 (1991-08-20)

D5: WO 03/045968 A (ANADYS PHARMACEUTICALS INC) 5 June 2003 (2003-06-05)

D6: US-A-4 880 784 (ROBINS ROLAND K ET AL) 14 November 1989 (1989-11-14)

D7: MICHAEL, M.A. ET AL.: "Alkylpurines as Immunepotentiating Agents: Synthesis and Antiviral Activity of Certain Alkylguanines" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 36, no. 22, 1993, pages 3431-3436, XP002307482

D8: LEE, J. ET AL: "Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 11, 27 May 2003 (2003-05-27), pages 6646-6651, XP002307483

D9: REITZ, A.B. ET AL.: "Small-Molecule Immunostimulants. Synthesis and Activity of 7,8-Disubstituted Guanosines and Structurally Related Compounds" J. MED. CHEM., vol. 37, no. 21, 1994, pages 3561-3578, XP002316151

Section III

1. Claims 1-74 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(i) PCT).

2. The following Opinion relates solely to that subject-matter which was searched (Rule 66.1(e) PCT).

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/US2004/028236

Section IV

3. This Authority considers that there are 2 inventions covered by the claims indicated as follows:

I: Claims 1-44 directed to methods of treating hepatitis C infections using TLR ligands.
II: Claims 45-74 directed to methods of treating diseases responsive to immunotherapy using "masked TLR ligand prodrugs".

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, were given during the search phase on Form PCT/ISA/206.

Section V

4. Claims 1-74 do not meet the requirements of Art. 33(2)-(3) PCT.

4.1 Invention I
The subject-matter of claims 1-44 is disclosed in D4-D6 (Art. 33(2) PCT). See the passages cited in the International Search Report.

4.2 Invention II
The subject-matter of claims 45-74 is disclosed in D4, D5 and D9 (Art. 33(2) PCT). See the passages cited in the International Search Report.

4.3 There does not appear to be any novel subject-matter in the claims which could be regarded as being inventive (Art. 33(3) PCT).

5. For the assessment of the present claims 1-74 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment

Section VI

337
3-34.

6. Documents D1-D3 are cited under Rules 64.3 and 70.10 PCT.

Section VIII

7. Objections to the expressions listed on Form PCT/ISA/210 are upheld under Art. 6 PCT.

339 335

Docket: 22222-00024-WO1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

In re Application of: ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.

Int'l Appln. No.: PCT/US2004/028236

Int'l Filing Date: 01 September 2004

For: Administration of TLR7 Ligands and Prodrugs Thereof for Treatment of Infection by Hepatitis C Virus

REQUEST FOR RECTIFICATION OF AN OBVIOUS ERROR UNDER PCT RULE 91

MS PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
Attn.: RO/US

Sir:

Applicant submits herewith replacement page number 1 of the Request to rectify an inadvertent error. As reflected on the replacement page, Devron R. Averett should be listed as "applicant and inventor" for the purposes of "the United States of America only."

No fee is believed due in connection with this paper. In the event any fee variance exists, please charge the fee to our Deposit Account No. 22-0185. A duplicate copy of this letter is enclosed for that purpose.

Respectfully submitted,

Dated: Oct 14, 2004

Mark J. Pino

Mark J. Pino, Reg. No. 43,858
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W., Suite 800
Washington, DC 20036-3425
(202) 331-7111

C:\NrPortbl\DC\DKNIGHT\[illegible]_1.DOC

3460
336.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 22222-24-WO1

Box No. I TITLE OF INVENTION

ADMINISTRATION OF TLR7 LIGANDS AND PRODRUGS THEREOF FOR TREATMENT OF INFECTION BY HEPATITIS C VIRUS

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.
3115 Merryfield Row
San Diego, California 92121

Telephone No. (858) 530-3600
Facsimile No. (858) 527-1540
Teleprinter No.
Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

AVERETT, Devron R.
2529 Newport Avenue
Cardiff By The Sea, California 92007

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/have been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

PINO, Mark J.
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W., Suite 800
Washington, DC 20036-3425
United States of America

Telephone No. (202) 331-7111
Facsimile No. (202) 293-6229
Teleprinter No.
Agent's registration No. with the Office 43,858

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum): 22222-24-WO1

337

Box No. I TITLE OF INVENTION

ADMINISTRATION OF TLR7 LIGANDS AND PRODRUGS THEREOF FOR TREATMENT OF INFECTION BY HEPATITIS C VIRUS

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.
3115 Merryfield Row
San Diego, California 92121

Telephone No.: (858) 530-3600
Facsimile No.: (858) 527-1540
Teleprinter No.:
Applicant's registration No. with the Office:

State (that is, country) of nationality: US
State (that is, country) of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

AVERETT, Devron R.
2529 Newport Avenue
Cardiff By The Sea, California 92007

This person is:
☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☒ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office:

State (that is, country) of nationality:
State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

PINO, Mark J.
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W., Suite 800
Washington, DC 20036-3425
United States of America

Telephone No.: (202) 331-7111
Facsimile No.: (202) 293-6229
Teleprinter No.:
Agent's registration No. with the Office: 43,858

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

347

338

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

I. If, in any of the Boxes except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the caption of the Box in which the space was insufficient, in particular:

(i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

(ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purpose of which the named person is applicant;

(iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purpose of which the named person is inventor;

(iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box IV;

(v) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).

3. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(c)).

Continuation of Box No. IV:

Practitioners associated with customer number 30678.

393

339

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection.

☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection.

☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection.

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the issuing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

	Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
			national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
Item (1)	05 September 2003 (05.09.2003)	60/500339	US		
Item (2)	10 November 2003 (10.11.2003)	60/518996	US		
Item (3)	10 November 2003 (10.11.2004)	60/518997	US		

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):*

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA/EP

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):*

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):* Number of declarations

☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

344

340

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:		This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:	Number of items
(a) in paper form, the following number of sheets:			
request (including declaration sheets)	: 4	1. [X] fee calculation sheet	: 1
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	: 113	2. [ ] original separate power of attorney	:
claims	: 20	3. [ ] original general power of attorney	:
abstract	: 1	4. [ ] copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
drawings	: 2	5. [ ] statement explaining lack of signature	:
Sub-total number of sheets	: 140	6. [ ] priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
sequence listings	:	7. [ ] translation of international application into *(language)*:	:
tables related thereto	:	8. [ ] separate indications concerning deposited microorganisms or other biological material	:
(for both, actual number of sheets (if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		9. [ ] sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*	
Total number of sheets	: 140	(i) [ ] copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:
(b) [ ] only in computer readable form (Section 801(a)(i))		(ii) [ ] *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked to left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:
(i) [ ] sequence listings		(iii) [ ] together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings just mentioned in left column	:
(ii) [ ] tables related thereto		10. tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*	
(c) [ ] also in computer readable form (Section 801(a)(ii))		(i) [ ] copy submitted for the purposes of international search under Section 802 (b-*quater*) only (and not as part of the international application)	:
(i) [ ] sequence listings		(ii) [ ] *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked to left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-*quater*)	:
(ii) [ ] tables related thereto		(iii) [ ] together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the		11. other *(specify)*:	:
[ ] sequence listing:			
[ ] tables related thereto:			
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)			
Figure of the drawings which should accompany the abstract: Two		Language of filing of the international application: English	

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Mark J. Pino

Mark J. Pino, Agent for Applicant(s)
CONNOLLY BOVE LODGE & HUTZ LLP

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		[ ] received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		[ ] not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. [ ] Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

345 341

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference: 22222-00024-WO1
International application No.: US04/028236	International filing date (day/month/year): 01 September 2004 (01.09.2004)	(Earliest) Priority date (day/month/year): 05 September 2003 (05.09.2003)
Title of invention: ADMINISTRATION OF TLR7 LIGANDS AND PRODRUGS THEREOF FOR TREATMENT OF INFECTION BY HEPATITIS C VIRUS		

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	Telephone No.: (858) 530-3600
ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. 3115 Merryfield Row San Diego, California 92121 United States of America	Facsimile No.: (858) 527-1540
	Teleprinter No.:
	Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US	State *(that is, country)* of residence: US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

AVERETT, Devron R.
2529 Newport Avenue
Cardiff By The Sea, California 92007
United States of America

State *(that is, country)* of nationality: US	State *(that is, country)* of residence: US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.

3466
3492

International application No.
US04/028236

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is [X] agent [ ] common representative

and [X] has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

[ ] is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

[ ] is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

PINO, Mark J.
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W., Suite 800
Washington, DC 20036-3425
United States of America

Telephone No.: (202) 331-7111
Facsimile No.: (202) 293-6229
Teleprinter No.:
Agent's registration No. with the Office: 43,858

[ ] Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

[X] the international application as originally filed

the description: [X] as originally filed; [ ] as amended under Article 34

the claims: [X] as originally filed; [ ] as amended under Article 19 (together with any accompanying statement); [ ] as amended under Article 34

the drawings: [X] as originally filed; [ ] as amended under Article 34

2. [ ] The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. [ ] The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. [ ] The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54*bis*.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

[X] which is the language in which the international application was filed.

[ ] which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.

[ ] which is the language of publication of the international application.

[ ] which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

International application No.
US04/028236

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purpose of international preliminary examination:

				For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1.	translation of international application	:	sheets	☐	☐
2.	amendments under Article 34	:	sheets	☐	☐
3.	copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	sheets	☐	☐
4.	copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	sheets	☐	☐
5.	letter	:	sheets	☐	☐
6.	other *(specify)*:	:	sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1. [X] fee calculation sheet
2. [ ] original separate power of attorney
3. [ ] original general power of attorney
4. [ ] copy of general power of attorney; reference number, if any:
5. [ ] statement explaining lack of signature
6. [ ] sequence listing in computer readable form
7. [ ] tables in computer readable form related to a sequence listing
8. [ ] other *(specify)*:

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Mark J. Pino

Mark J. Pino, Agent for Applicant(s)
CONNOLLY BOVE LODGE & HUTZ LLP

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
   ☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.
6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54*bis*.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

REPÚBLICA DE COLOMBIA

GAVIRIA 348

3.44

ORGANIZACIÓN ELECTORAL
REGISTRADURÍA NACIONAL DEL ESTADO CIVIL

REGISTRO CIVIL DE DEFUNCIÓN

Indicativo Serial 5562241

Datos de la oficina de registro

Clase de oficina: Registraduría [ ] Notaría [X] Consulado [ ] Corregimiento [ ] Insp. de Policía [ ] Código 9795

País - Departamento - Municipio - Corregimiento e/o Inspección de Policía

COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D..C NOTARIA 32.

Datos del inscrito

Apellidos y nombres completos

CASTRO DUQUE RAMIRO

Documento de identificación (Clase y número)	Sexo (en Letras)
C.C. No.' 170322 DE BOGOTA ------------	MASCULINO

Datos de la defunción

Lugar de la Defunción: País - Departamento - Municipio - Corregimiento e/o Inspección de Policía

COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C.

Fecha de la defunción	Hora	Número de certificado de defunción
Año 2004 Mes 10 Día 30	04:10 PM	A- 2094375.

Presunción de muerte

Juzgado que profiere la sentencia	Fecha de la sentencia
------------------	Año Mes Día

Documento presentado	Nombre y cargo del funcionario
Autorización judicial [ ] Certificado Médico [X]	ANDRES DIAZ CAMPOS.- R. M. No. 79982662

Datos del denunciante

Apellidos y nombres completos

EDGAR DAVID REGINO H.

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
C.C. No. 15.030.154 DE LORICA/ CORDOBA	[firma]

Primer testigo

Apellidos y nombres completos

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
------------------	------------

Segundo testigo

Apellidos y nombres completos

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
------------------	------------

Fecha de inscripción	Nombre y firma del funcionario que autoriza
Año 2004 Mes 11 Día 02	BLANCA LUCIA ARBELAEZ RESTREPO NOTARIA

ESPACIO PARA NOTAS

PADRES: ALFONSO CASTRO
MERCEDES DUQUE.

ORIGINAL PARA LA OFICINA DE REGISTRO

349
345



AS: 99.282

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

POWER OF ATTORNEY

I (We) Anadys Pharmaceuticals, Inc.

domiciled in 3115 Merryfield Row
San Diego, CA 92121 - USA

Hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; penal demands, actions of indemnities for damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

this 26 day of OCT 2004

Signature

NOTARIA 32
DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, D.C.

Germán Eleázar Moreno L.
Notario

COMO SECRETARIO DELEGADO DE LA NOTARIA TREINTA Y DOS (32) DEL CIRCULO DE BOGOTA

CERTIFICO QUE:

La presente acta es fiel copia del original tomada del registro civil de defunciones serial indicativo número: ST6224

que expido en la ciudad de Bogotá D.C., hoy: 05 NOV. 2004

NELSON FLOREZ C.
SECRETARIO DELEGADO

NOTARIA 32 DEL C...
...BOGOTA D.C.
NELSON FLOREZ C.
SECRETARIO DELEGADO PARA COPIAS
DECRETO 1334 DE 1991

3P
346.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 26 day of Oct of 04 personally appeared before me Devron R. Averett, Ph.D.

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

Senior Vice President, Drug Development

of

Anadys Pharmaceuticals, Inc.
3115 Merryfield Row
San Diego, CA 92121

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of California
under date of 10/26/2004

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

ATTA HILAL
Commission # 1301747
Notary Public — California
San Diego County
My Comm. Expires Apr 21, 2005

Notary Public (Seal)

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se extendió la presente fotocopia que coincide con el original que se me fue presentado a la vista.
04 ABR. 2006
NOTARIO CUARENTA
Agustín Castillo Zárate
Bogotá, D.C. Colombia

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON

On this 26 day of Oct of 04 personally appeared before me

Devron R. Averett

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

ATTA HILAL
Commission # 1301747
Notary Public — California
San Diego County
My Comm. Expires Apr 21, 2005

Notary Public (Seal)

351

347

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by ATTA HILAL*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of ATTA HILAL, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 28th day of October 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 214075*
9. *Seal/Stamp:*

Ante la Notaría Cuarenta de este círculo se cotejó la presente fotocopia con el original que se le presentó a la vista.

04 NOV. 2006

NOTARIO CUARENTA
Cristina Castillo Zárate
Bogotá, D.C., Colombia

10. Signature

Kevin Shelley

KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY

NP-34 A (REV. 1-03)

OSP 03 74700

JK 348

TRADUCCIÓN SIMPLE AL ESPAÑOL del la Apostilla que vienen junto el certificado notarial y el Poder concedido por Anadys Pharmaceuticlas, Inc., domiciliada en 3115 Merryfield Row, San Diego, California 91121, Estados Unidos de América, a Ramiro Castro Duque y/o Hector Gomez Mejía, domiciliados en la Carrera 7 #16-56, P. 9, Bogotá D.C., Colombia.

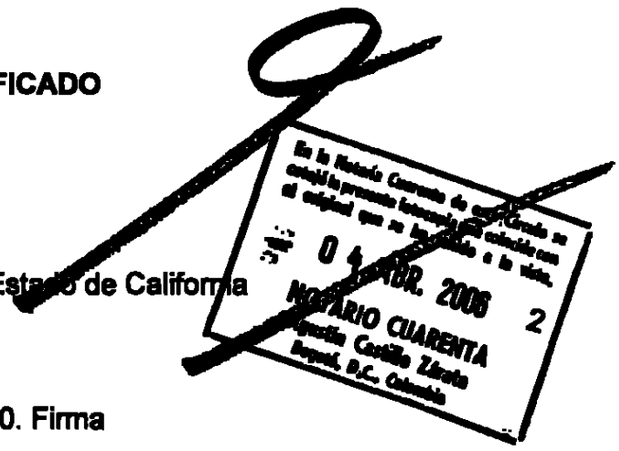
APOSTILLE

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
   Este documento público
2. ha sido firmado por ATTA HILAL
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello de: ATTA HILAL, Notario Público,
   Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 28 de Octubre de 2004
7. por Secretario de Estado Encargado, Estado de California
8. No. 214075
9. Sello



10. Firma

KEVIN SHELLEY (Firma)
KEVIN SHELLEY
Secretario de Estado

353

341

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-032880- -00000-0000 Fec: 2006-04-04 16:58:18
Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE/YU Eve 379 FABENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 352

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN (✓) MODELO DE UTILIDAD ( )	( )	( )
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	(✓)
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	(✓)
-Descripción de la invención.	( )	(✓)
-Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	(✓)
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	( )	(✓)
COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	( )	( )
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	( )	( )
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	( )	( )
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )	( )	( )

Firma Responsable: _____

Fecha: Abril 04 de 2006.

350

PETITORIO

J.707

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-032880- -00000-0000 Fec: 2006-04-04 16:58:18
Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEVII Eva 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 382

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL : 05-04-2006

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.** Dirección: 3115 Merryfield Row, San Diego, CA 92121, Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual____ Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: HECTOR GOMEZ MEJIA Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual____ Número 22720 TP 19436
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Devron R. Averett Dirección: 2529 Newport Avenue, Cardiff By The Sea, CA 92007, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/028236 Fecha 01-09-2004
Publicación Internacional No. WO 2005/025583 A3 Fecha 24-03-2005

Título (54): ADMINISTRACIÓN DE LIGANDOS TLR7 Y SUS PROFÁRMACOS PARA TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

7 Clasificación Internacional (51) A61K31/708, A61P31/14.

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	05-09-2003	60/500,339
US	10-11-2003	60/518,996
US	10-11-2003	60/518,997

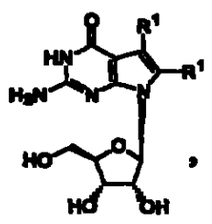
9 Memorando de cargo No. 06-11544 **Fecha** 03-04-2006

Lo que se reivindica es:

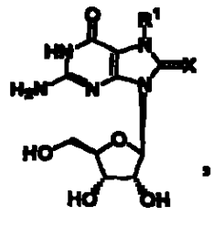
1. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar al paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable.

2. Un método de tratar una infección por el virus de hepatitis C en un paciente, que comprende administrar al paciente necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ligando TLR7 o su sal, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable, en donde el ligando TLR7 se selecciona de análogos y derivados de guanosina, imidazoquinolina, adenina, y pirimidina.

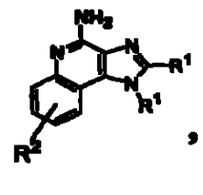
3. El método de la reivindicación 2 en donde el ligando TLR7 se selecciona de



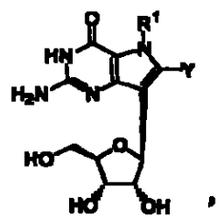
Ia



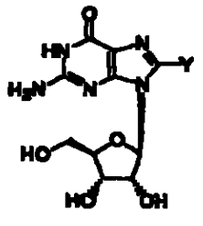
Ib



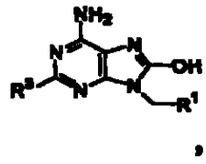
Ic



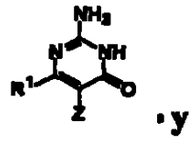
Id



Ie

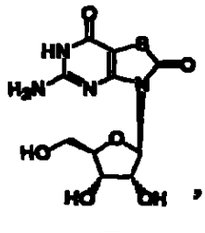


If



Ig

y



Ih

354

352

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
GOMEZ MEJIA HECTOR
Apoderado(a) y/o Representante de
ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	06 32880
	Solicitud internacional	US2004/028236
	Fecha inicio fase nacional	05/04/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	437
	Oficio No.	8497

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 AGO 2006
jramos