



CSA461121

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

**PCT**
SOLICITUD**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

08-3967254. TÍTULO 4'- NUCLEOSIDOS MODIFICADOS COMO
AGENTES ANTIVIRICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE PHARMASSET, INCDOMICILIO 303 A. College Road East, Princeton, New Jersey,
Estados Unidos de America.74. APODERADO Jerónimo Castillo Bonilla

22. BOGOTÁ, D. C., _____

SS

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-039672- -00000-0000

Fecha: 2008-04-18 17:01:40 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE/II Eje: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

X
Y

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II

2 SOLICITANTE
(71)

Nombre: PHARMASSET, INC.
Dirección: 303A College Road East, Princeton,
New Jersey, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: estadounidense
Lugar de Constitución: Delaware
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual

Número

3 REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JERONIMO CASTILLO BONILLA
Dirección: Calle 93A #14-17, Ofc 311
Bogotá, D.C.
Teléfono: 2 363493 Fax: 2 182351
E-mail: info@pcastillopineda.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual

Número 79462057 TP 104167

4 INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: DU, Jinfa
Dirección: 1206 Reins Circle, New Hope, Penssylvania, Estados
Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: estadounidense

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/037470

Fecha Septiembre 26, 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/038507 A2

Fecha Abril 5, 2007

6 Título (54) 4'-NUCLEOSIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES ANTIVIRICOS

7 Clasificación Internacional (51)

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

26/09/2005

60/720.388

9 Comprobante de pago No.

Fecha

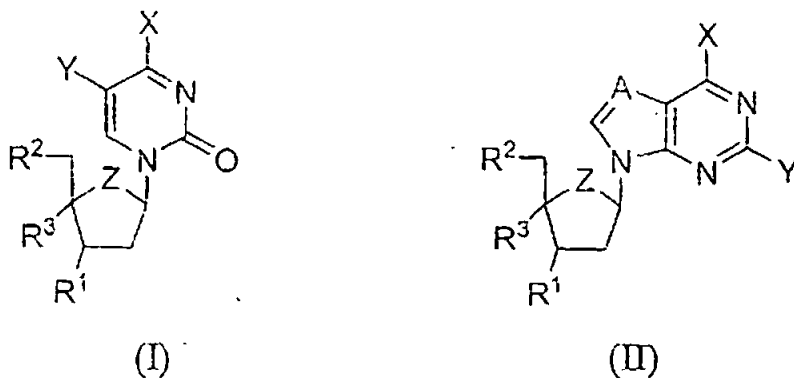
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de representación de la solicitud.
☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
☐ Poderes, si fuere el caso.
☐ Documentos de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
☐ Declaraciones.
☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
☐ Traducción del examen preliminar internacional 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.
☒ Ane final 12x12.
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
☒ Otros. Publicación Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE:

JERONIMO CASTILLO BONILLA

FIRMA:

C.C. 79462057

T.P. 104167

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

(Continuación Inventores)

- Nombre : FURMAN, Phillip
- Dirección : 5 Quincy Court, Princeton, New Jersey, Estados Unidos de América
- Nacionalidad : Estadounidense

- Nombre : SOFIA, Michael
- Dirección : 137 Washington Drive, Southington, Connecticut, Estados Unidos de América
- Nacionalidad : Estadounidense

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

5 de abril de 2007 (5.04.2007)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT WO 2007/038507 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/7072 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2006/037470

(22) Fecha de Presentación Internacional:
26 de septiembre de 2006 (26.09.2006)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/720,388 26 de septiembre de 2005 (26.09.2005) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): PHARMASSET, INC. [US/US]; 303a College Road East, Princeton, NJ 08540 (US)

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): DU, Jinfa [US/US]; 1206 Reins Circle, New Hope, PA 18938 (US). FURMAN, Phillip [US/US]; 5 Quincy Court, Princeton, NJ 08540 (US). SOFIA, Michael [US/US]; 137 Washington Drive, Southington, CT 06489 (US).

(74) Agentes: BRUESS, Steven, C.; Merchant & Gould P.C., P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

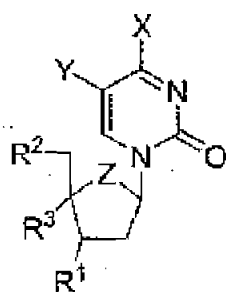
(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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 y a volverse a publicar al recibo de dicho informe

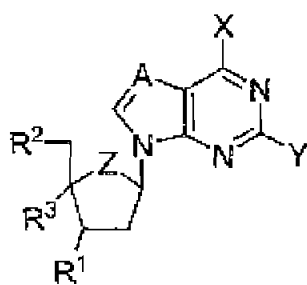
Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

(54) Título: 4'-NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES ANTIVÍRICOS



(I)

(57) Extracto: Se proveen compuestos, métodos y composiciones para tratar un anfitrión infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana y con el virus de la hepatitis B, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un 4'-C-sustituido/3-D- y /3-L-nucleósido descrito, o su sal o profármaco farmacéuticamente aceptable.



(II)

4'-NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES ANTIVÍRICOS

Esta solicitud se presenta el 26 de septiembre de 2006 como solicitud Internacional de Patente PCT a nombre de de PHARMASSET, INC., una corporación nacional de los Estados Unidos, solicitante para todos los países, excepto los Estados Unidos, y Jinfa Du, Phillip Forman, y Michael Sofia, todos ciudadanos de los Estados Unidos, solicitantes para la designación de los Estados Unidos únicamente. Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/720,388, presentada el 26 de septiembre de 2005.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención es en el área de la química farmacéutica y, en particular, es un compuesto, un método y una composición para tratar un anfitrión infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (denominado en lo sucesivo "HIV"), el virus de la hepatitis B (denominado en lo sucesivo "HBV"), o ambos, HIV y HBV, que comprende administrar una cantidad efectiva de un β -D- y β -L-4'-C-sustituido -3'-fluoro- y 3'-azido-3'-deoxinucleósido descrito o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En 1981, el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se identificó como una enfermedad que compromete gravemente el sistema inmunitario humano que, casi sin excepción, lleva a la muerte. En 1983, se determinó que la causa etiológica del SIDA era el HIV.

En 1985, se informó que nucleósido sintético 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT) inhibe la replicación del HIV. Desde entonces, se ha demostrado que un número de otros nucleósidos sintéticos, incluidos 2',3'-dideoxiinosina (DDI), 2',3'-dideoxicitidina (DDC) y 2',3'-dideoxi-2',3'-didehidrotimidina (D4T) son efectivos contra HIV. Luego de la fosforilación celular al 5'-trifosfato por cinasas celulares, estos nucleósidos sintéticos se incorporan en una hebra creciente de ADN vírico, que causa la terminación de la cadena debido a la ausencia del grupo 3'-hidroxilo. Pueden inhibir asimismo la enzima vírica transcriptasa inversa.

El éxito de varios nucleósidos sintéticos en inhibir la replicación del HIV *in vivo* o *in vitro* ha llevado a un número de investigadores a diseñar y analizar nucleósidos que sustituyen un heteroátomo por el átomo de carbono en la posición 3' del nucleósido (Norbeck et al. 1989, *Tetrahedron Letters*, 30 (46) 6246,

Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 0 337 713 y Patente de los Estados Unidos No. 5,041,449).

La Patente de los Estados Unidos No. 5,047,407 y la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 0 382 526 divulgan un número de nucleósidos racémicos 2'-sustituido-5'-sustituido-1,3-oxatolano con actividad antivírica y, específicamente, informan que la mezcla racémica (alrededor de la posición C4') del C1'- β isómero de 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatolano ($\pm$)-BCH-189) tiene aproximadamente la misma actividad contra HIV que la AZT y ninguna toxicidad celular en las concentraciones analizadas. Se ha descubierto asimismo que ($\pm$)-BCH-189 inhibe la replicación de aislados de HIV resistentes a AZT *in vitro* de pacientes que han sido tratados con AZT por períodos superiores a 36 semanas. El (-)-enantiómero del isómero de BCH-189, conocido como 3TC, es altamente potente contra HIV y exhibe poca toxicidad. (-)-cis-2-Hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatolano ("FTC") tiene igualmente una potente actividad HIV (Schinazi et al. 1992 *Antimicrob. Agent and Chemotherap*, 2423-2431).

Recientemente, se ha informado que nucleósidos 4'-C-sustituidos muestran una potente actividad anti-HIV (Siddiqui, M. A. et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 5041-5048; Nomura, M. et al. J. Med. Chem. 1999, 42, 2901-2908).

Otro virus que causa un serio problema de salud humana es HBV. El HBV es el segundo únicamente frente al tabaco como causa del cáncer humano. El mecanismo por el cual el HBV induce el cáncer es desconocido, aunque se postula que puede desencadenar directamente el desarrollo tumoral, o indirectamente desencadenar el desarrollo tumoral mediante la inflamación crónica, la cirrosis y la regeneración celular asociada con la infección.

Luego de un período de incubación de seis meses, en el cual el anfitrión no es conciente de la infección, la infección por HBV puede llevar a hepatitis aguda y lesión del hígado que ocasiona dolor abdominal, ictericia y niveles sanguíneos elevados de ciertas enzimas. El HBV puede causar hepatitis fulminante, una forma fatal a menudo, de evolución rápida, de la enfermedad, en la cual secciones masivas del hígado son destruidas.

En los países occidentales industrializados, grupos de alto riesgo para la infección por HBV incluyen aquellos en contacto con portadores de HBV o sus muestras de sangre. La epidemiología del HBV es muy similar al síndrome de la deficiencia inmunitaria adquirida, que explica por qué la infección por HBV es común entre pacientes con SIDA o el complejo relacionado con SIDA. Sin embargo, el HBV es más contagioso que el HIV. Los dos FTC y 3TC exhiben

actividad contra el HBV (Furman et al. 1992 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2686-2692).

Se ha desarrollado una vacuna derivada del suero humano para inmunizar pacientes contra el HBV. Aunque se encontrado efectiva, la producción de la vacuna es problemática debido a que el suministro de suero humano de portadores crónicos es limitado y el procedimiento de purificación es prolongado y costoso. Además, cada lote de vacuna preparada de suero diferente tiene que probarse en chimpancés para garantizar la seguridad. De igual manera se han producido vacunas mediante ingeniería genética. Tratamientos diarios con interferón α , una proteína genéticamente modificada, han demostrado también ser promisorios.

A la luz del hecho de que el síndrome de la deficiencia inmunitaria adquirida, el complejo relacionado con el SIDA y el virus de la hepatitis B han alcanzado niveles epidémico en todo el mundo, y tienen efectos trágicos sobre el paciente infectado, subsiste una fuerte necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos efectivos para tratar estas enfermedades y que tengan una baja toxicidad para el anfitrión.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención divulga compuestos, su síntesis, métodos y composiciones para tratar un anfitrión infectado con HIV, HBV, o ambos, HIV y HBV, que comprende administrar una cantidad efectiva de un β -D- y β -L-4'-C-sustituido-3'-fluoro- y 3'-azido-3'-deoxinucleósido descrito, o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 representa estructuras químicas de 4'-nucleósidos modificados como agentes antiviricos.

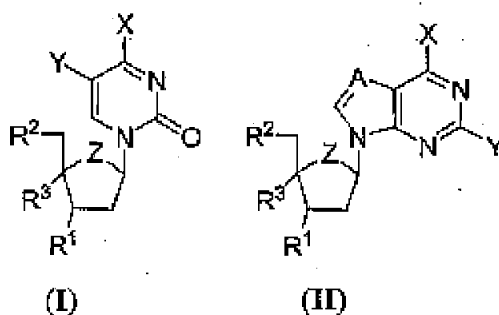
FIG. 2 es un ejemplo ilustrativo no limitante de la síntesis de 4'-C-etinil-3'-fluorotimidina (**1a**, $R^1 = F$, $R^2 = OH$, $R^3 = \text{etinilo}$) o 4'-C-etinil-3'-azidotimidina (**1a**, $R^1 = N_3$, $R^2 = OH$, $R^3 = \text{etinilo}$).

FIG. 3 es un ejemplo ilustrativo no limitante de la síntesis de 4'-C-etinil-3'-fluoro-2',3'-dideoxinucleósidos (**29**, $R^1 = F$) y 3'-azido-2',3'-dideoxinucleósidos (**29**, $R^1 = N_3$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método y a una composición para tratar HIV, las infecciones con HBV, o ambos, HIV y HBV, en un anfitrión, que comprende administrar una cantidad efectiva de los 3'-fluoro- y 3'-azido-3'-dideoxynucleósidos β -D- y β -L-4'-C-sustituídos descritos, o sus sales y profármacos farmacéuticamente aceptables.

Más específicamente, un primer aspecto de la presente invención se dirige a compuestos, métodos y composiciones para tratar un anfitrión infectado con HIV, HBV, o ambos, HIV y HBV, que comprende administrar una cantidad efectiva de un β -D- y β -L-nucleósido descrito de las fórmulas I y II o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable,



en donde:

X es hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , or CF_3 .

Y es hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R^1 es F o N_3 ;

R^2 es OH , OR^4 , OC(O)R^4 , $\text{OP}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{P}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OCH}_2\text{OP}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OP(O)(OQ)}_a(\text{NHR}^4)_b$, SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, SC(O)R^4 , NH_2 , NHC(O)R^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , o NHNHR^4 ;

R^3 es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluorovinilo, alquilo (C_{1-6}), uno a tres alquilo (C_{1-6}) halógeno sustituido, alquenilo (C_{1-6}) o alquinilo (C_{1-6}) siempre que cuando R^1 es N_3 , R^3 no es hidroximetilo;

Z es O, S, CH_2 o C=CH_2 ;

A es N, CH, o CF; y

R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alquenilo inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo, tal como fenilo o bencilo sustituido o no sustituido;

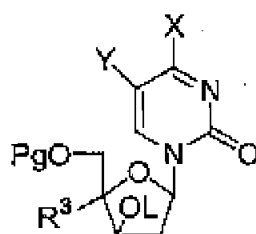
M es por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por H^+ , Na^+ , y K^+ ;

v tiene un valor de 1, 2, ó 3;

x, y, y z son independientes uno de otro y tienen un valor de 0, 1, 2, 3, ó 4; y

a tiene un valor de 0 ó 1, b tiene un valor de 1 ó 2, y Q es M ó R^4 .

Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a un intermedio de la fórmula:



en donde

X es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , $NHOH$, $NHOR^4$, $NHNH_2$, NR^4NH_2 , $NHNHR^4$, SH, SR^4 , $S(O)R^4$, $S(O)_2R^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, o CF_3 ;

Y es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , $NHOH$, $NHOR^4$, $NHNH_2$, NR^4NH_2 , $NHNHR^4$, SH, SR^4 , $S(O)R^4$, $S(O)_2R^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, CF_3 , hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R^3 es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluorovinilo, alquilo (C_{1-6}), uno a tres alquilo (C_{1-6}) halógeno sustituido, alquenilo (C_{1-6}) o alquinilo (C_{1-6}) siempre que cuando R^1 es N_3 , R^3 no es hidroximetilo;

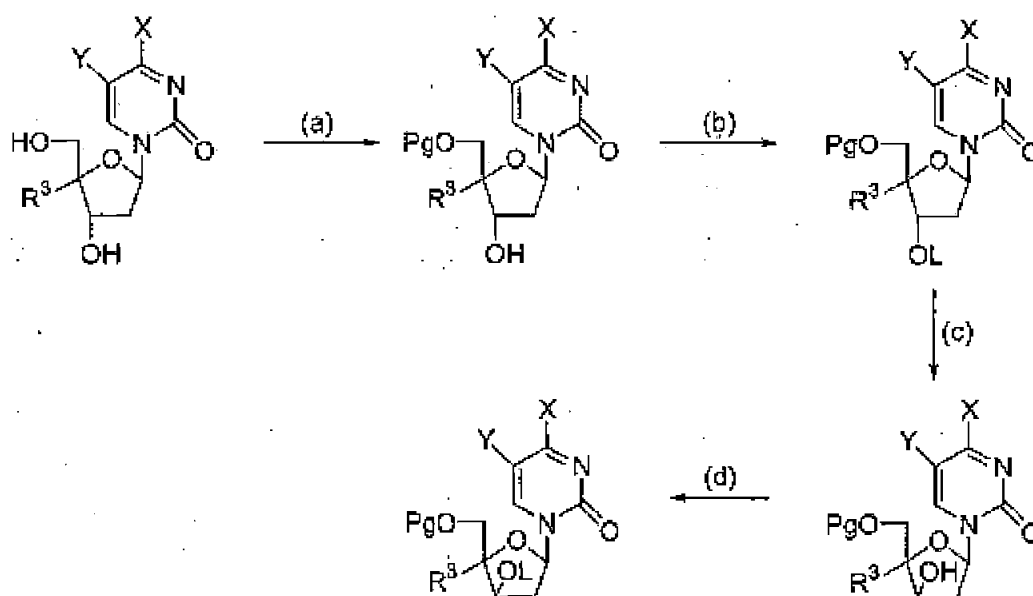
Pg es un grupo protector hidroxilo que incluye, pero no se limita a tritilo, dimetoxitritilo, y t-butil-sililo;

L un grupo saliente que incluye, pero no se limita a un sulfonilo, un trifluorosulfonilo, un sulfonato no sustituido, un sulfonato sustituido, un carbonato no sustituido y un carbonato sustituido; y

R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alquenilo inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo.

Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un proceso para la preparación de un intermedio divulgado en el segundo aspecto de la presente invención, que comprende:

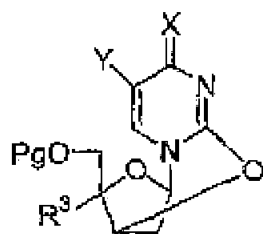
- (a): proteger selectivamente un 5'-OH con un grupo protector, Pg, para formar un grupo 5'-OPg;
- (b): activar un 3'-OH con un grupo saliente, L, para formar un grupo 3'-OL;
- (c): hacer reaccionar un 3'-C con una base hidróxido, con el fin de convertir la posición 3'-C de una configuración ribo- a una configuración xilo;
- (d): activar un 3'-OH, que tiene una configuración xilo, con un grupo saliente, L, para formar un grupo 3'-OL;



en donde

la base hidróxido incluye, pero no se limita a NaOH, KOH, y R^4 NOH, y sus mezclas.

Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a un intermedio de la fórmula:



en donde

X es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , $NHOH$, $NHOR^4$, $NHNH_2$, NR^4NH_2 , $NHNHR^4$, SH , SR^4 , $S(O)R^4$, $S(O)_2R^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , o CF_3 .

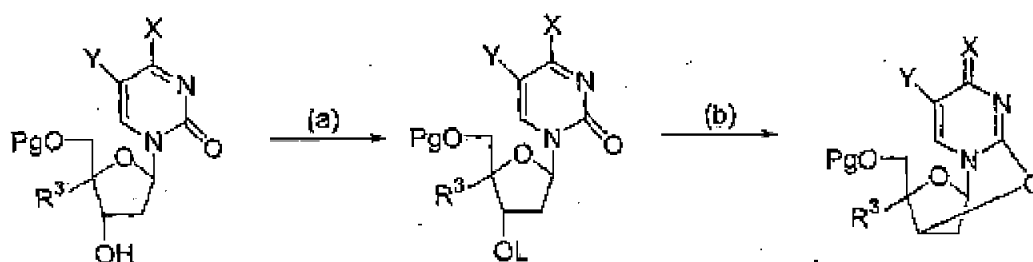
Y es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R^3 es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluoro vinilo, alquilo (C_{1-6}), uno a tres alquilo (C_{1-6}) halógeno sustituido, alquenilo (C_{1-6}) o alquinilo (C_{1-6}) siempre que cuando R^4 es N_3 , R^3 no es hidroximetilo; Pg es un grupo protector hidroxilo que incluye, pero no se limita a , tritilo, dimetoxitritilo, y t-butil-sililo; y

R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alquenilo inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo.

Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a un proceso para la preparación del intermedio divulgado en el cuarto aspecto de la presente invención, que comprende:

- (a): activar un 3'-OH de un nucleósido a 5'-O-protegido con un grupo saliente, L; para formar un grupo nucleósido 3'-OL-5'-O-protegido; seguido por
- (b): tratar el nucleósido 3'-OL-5'-O-protegido con DBU (1,8- diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno) o DBN (1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno); con el fin de obtener el intermedio;



en donde L incluye, pero no se limita a un sulfonilo, un trifluorosulfonilo, un sulfonato sustituido, un sulfonato no sustituido, un carbonato no sustituido y un carbonato sustituido.

Se describirán ahora en detalle varias incorporaciones de la invención. Tal como se emplea en la descripción contenida en esta solicitud y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un," "uno," y "el" incluye la referencia en plural, a menos que el contexto estipule claramente lo contrario. Además, tal como se emplea en la descripción contenida en esta solicitud y todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre", a menos que el contexto estipule claramente lo contrario.

Generalmente, los términos empleados en esta especificación tienen los sus significados ordinarios en el arte, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se emplea cada término. A continuación se discuten ciertos términos que se usan para describir invención, o en alguna otra parte de la especificación, para ofrecer orientación adicional al profesional médico en describir las composiciones y métodos de la invención y cómo hacer uso de ellos. Para efectos de conveniencia, ciertos términos pueden resaltarse, por ejemplo, utilizando cursiva y/o comillas. El hecho de resaltar no tiene influencia en el alcance y significado de un término; el alcance y significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, independientemente de que se resalte o no. Se observará que la misma cosa puede decirse en más de una forma. En consecuencia, pueden utilizarse un lenguaje y sinónimos alternativos para uno cualquiera o más de los términos descritos en esta solicitud, ni hay que otorgar una importancia especial al hecho de que un término se amplíe o discuta o no en esta solicitud. Se dan sinónimos de ciertos términos. La cita de uno o más sinónimos no excluye el empleo de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte en esta especificación, incluidos ejemplos de cualesquiera términos discutidos en esta solicitud, es ilustrativo únicamente, y en ningún modo limita el ámbito y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Análogamente, la invención no se limita a varias incorporaciones dadas en esta especificación.

Tal como se emplea en esta solicitud, "alrededor de" o "aproximadamente" significará dentro de 20% por ciento, preferiblemente dentro de 10% por ciento y, más preferiblemente, dentro de 5% por ciento de un valor o rango dado. Las cantidades numéricas dadas en esta solicitud son aproximadas, significando que el término "alrededor de" o "aproximadamente" puede inferirse si no se declara expresamente.

Los compuestos divulgados, o sus derivados farmacéuticamente aceptables o sales o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos, son útiles en la prevención y tratamiento de infecciones HIV y otras enfermedades relacionadas tales como el complejo relacionado con SIDA (ARC), linfadenopatía generalizada persistente (PGL), afecciones nerviosas relacionadas con SIDA, y enfermedades anticuerpo anti-HIV positivas y HIV-positivas, sarcoma de Kaposi, trombocitopenia purpúrea e infecciones oportunistas. Además, estos compuestos o formulaciones pueden usarse profilácticamente para prevenir o retrasar la evolución de indisposición clínica en

individuos, que son anticuerpo anti-HIV o HFV-antígeno positivas, o que se han expuesto a HIV.

Los compuestos y sus derivados farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen el compuesto o sus derivados son también útiles en la prevención y tratamiento de infecciones HBV y otras dolencias relacionadas tales como enfermedades anticuerpo anti-HBV positivas y HBV-positivas, inflamación crónica del hígado causada por HBV, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis persistente crónica y fatiga. Estos compuestos o formulaciones pueden utilizarse asimismo profilácticamente par prevenir o retrasar la evolución de dolencia clínica en individuos que son anticuerpo anti-HBV o HBV-antígeno positivos o que se han expuesto a HBV.

Los compuestos pueden convertirse en un éster farmacéuticamente aceptable mediante reacción con un agente esterificado apropiado, por ejemplo, un haluro ácido o anhídrido. Los compuestos o su derivado farmacéuticamente aceptable pueden convertirse en su sal farmacéuticamente aceptable en una manera convencional, por ejemplo, mediante tratamiento con una base apropiada. El éster o sal del compuesto puede convertirse en el compuesto precursor, por ejemplo, por hidrólisis.

El término "independientemente" se emplea en esta solicitud para indicar que la variable, que se aplica independientemente, varía independientemente de una aplicación a otra. Por consiguiente, en un compuesto tal como R^aXYR^a , en donde R^a es "independientemente carbono o nitrógeno," ambos R^a pueden ser carbono, ambos R^a pueden ser nitrógeno, o un R^a puede ser carbono y el otro R^a nitrógeno.

Tal como se emplea en esta solicitud, el término "enantioméricamente puro" se refiere a una composición de nucleósido que comprende por lo menos aproximadamente 95% y, preferiblemente, aproximadamente 97%, 98%, 99% ó 100% de un enantiómero único de ese nucleósido.

Tal como se emplea en esta solicitud, el término "sustancialmente libre de" o "sustancialmente en la ausencia de" se refiere a una composición de nucleósido, que incluye por lo menos 85 ó 90% en peso, preferiblemente 95% a 98% en peso y, aún más preferiblemente, 99% a 100% en peso, del enantiómero designado de ese nucleósido. En una incorporación preferida, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres del enantiómero no designado de ese nucleósido. Análogamente, el término "aislado" se refiere una composición de nucleósido que incluye por lo menos 85 ó 90% en peso, preferiblemente 95% a 98% en peso y, aún más preferiblemente, 99% a

100% en peso, del nucleósido, conteniendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.

El término "alquilo," tal como se emplea en esta solicitud, a menos que se indique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo recto saturado, ramificado, o cíclico, primario, secundario, o terciario de, típicamente, C₁ a C₁₀ y, específicamente, incluye metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituido como no sustituido. Los grupos alquilo pueden sustituirse opcionalmente con una o más fracciones seleccionadas del grupo conformado por hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable, que no inhiba la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea no protegido, ya sea protegido, según sea necesario, como se conoce por los expertos en el arte, por ejemplo, como se enseña en Greene *et al.* 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd Edition, incorporado en esta solicitud por referencia.

El término "alquilo inferior," tal como se emplea en esta solicitud, y a menos que se indique lo contrario, se refiere a un grupo alquilo C₁ a C₄ recto saturado, ramificado, o si se considera apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), incluidas las formas sustituidas y no sustituidas. A menos que se declare específicamente de otro modo en esta solicitud, cuando alquilo es una fracción apropiada, se prefiere alquilo inferior. Análogamente, cuando alquilo o alquilo inferior es una fracción apropiada, se prefiere alquilo o alquilo inferior no sustituido.

El término "alquenilo inferior," tal como se emplea en esta solicitud, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un grupo alquenilo C₂ a C₄ recto insaturado o ramificado, incluidas las dos formas sustituidas y no sustituidas. A menos que se declare específicamente de otro modo en esta solicitud, cuando alquenilo es una fracción apropiada, se prefiere alquenilo inferior. Análogamente, cuando alquenilo o alquenilo inferior es una fracción apropiada, se prefiere alquenilo o alquenilo inferior no sustituido.

Los términos "alquilamino" o "arilamino" se refieren a un grupo amino que tiene uno o dos radicales alquilo o arilo, respectivamente.

El término "protegido," tal como se emplea en esta solicitud y a menos que se defina lo contrario, se refiere a un grupo que se agrega a un átomo de oxígeno, nitrógeno, o fósforo para evitar su reacción adicional o para otros propósitos. Una

amplia variedad de grupos protectores oxígeno y nitrógeno son conocidos por los expertos en el arte de la síntesis orgánica.

El término "arilo," tal como se emplea en esta solicitud y, a menos que se especifique otra cosa, se refiere a fenilo, bifenilo, o naftilo y, preferiblemente, fenilo. El término incluye fracciones tanto sustituidas como no sustituidas. El grupo arilo puede sustituirse con una o más fracciones seleccionadas del grupo conformado por hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfórico, fosfato, o fosfonato, no protegido, o protegido según sea necesario, como lo saben los expertos en el arte, por ejemplo, como se enseña en Greene *et al.* 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd Edition.

Los términos "alcarilo" o "alquilarilo" se refieren a un grupo alquilo con un radical arilo. Los términos "aralquilo" o "arilalquilo" se refieren a un grupo arilo con un radical alquilo.

El término "halo", tal como se emplea en esta solicitud, incluye cloro, bromo, yodo y fluoro.

El término "acilo" se refiere a un éster de ácido carboxílico en el cual la fracción no-carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo recto, ramificado, o cíclico o alquilo inferior, alcoxialquilo incluido metoximetilo, aralquilo incluido bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo incluido fenilo sustituido opcionalmente con halógeno (F, Cl, Br, I), C₁ a C₄ alquilo o C₁ a C₄ alcoxi, ésteres de sulfonato tales como alquilo o aralquilsulfonilo incluido metanosulfonilo, el éster mono, di- o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo) o difenilmetilsililo. Grupos arilo en los ésteres comprenden de manera óptima un grupo fenilo.

El término "acilo inferior" se refiere a un grupo acilo en el cual la fracción no-carbonilo es alquilo inferior.

El término "anfitrión," tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el cual el virus puede replicarse, incluidas líneas celulares y animales y, preferiblemente, un humano. Alternativamente, el anfitrión puede estar portando una parte del genoma vírico, cuya replicación o función pueden alterarse por los compuestos de la presente invención. El término anfitrión se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma vírico, y animales, en particular, primates y humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el anfitrión es un paciente humano. Aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, sin embargo, están claramente anticipadas por la presente invención.

El término "sal o profármaco farmacéuticamente aceptable" se utiliza a lo largo de toda la especificación para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto que, luego de la administración a un paciente, provee el compuesto activo. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Sales apropiadas incluyen las derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en el arte farmacéuticos.

Profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo se hidroliza u oxida, en el anfitrión para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en una fracción funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden oxidarse, reducirse, aminarse, desaminarse, hidroxilarse, deshidroxilarse, hidrolizarse, deshidrolizarse, alquilarse, desalquilarse, acilarse, desacilarse, fosforilarse, desfosforilarse para producir el compuesto activo.

1. Ejemplo no limitante de la síntesis de 4'-c-etinil-3'-fluoro- y 3'-azidotimidinas (véase Figura 2)

El tratamiento de timidina con 2.2-2.5 moles de cloruro de t-butildimetilsililo en cloruro de metileno en la presencia de imidazol, seguido por desprotección selectiva de un grupo 5'-O-sililo en 80% ácido acético en la presencia de ácido trifluoroacético produjo el compuesto **2**. La oxidación de **2** con DCC en DMSO en la presencia de trifluoroacetato de piridinio produjo un aldehído **3** luego de la purificación cromatográfica de columna en gel de sílice en un rendimiento excelente. El tratamiento de un compuesto **3** con formaldehído acuoso en una mezcla de 1,4-dioxano y agua en la presencia de 2N NaOH, seguido por la reducción del intermedio resultante por NaBH₄ produjo el diol **4**. La protección selectiva del diol **4** con cloruro de dimetoxitritilo en piridina produjo el compuesto **5**. El tratamiento de un compuesto **5** con cloruro de t-butildifenilsililo en cloruro de metileno en la presencia de imidazol, seguido por detritilación en 80% ácido acético produjo el compuesto **6**. La oxidación del alcohol **6** con DCC en DMSO en la presencia de trifluoroacetato de piridinio proporcionó el compuesto **7**. La reacción del compuesto **7** con reactivo de Wittig clorometileno, seguido por la eliminación mediante el tratamiento con butil litio proporcionó el 4'-C-etinil

nucleósido **8**. El tratamiento de **8** con fluoruro de tetrabutilamonio en THF produjo la 4'-C-etinil-timidina **9**. El tratamiento de **9** con DMTrCl en piridina produjo el compuesto **10**. El compuesto **10** se convirtió en **11** mediante tratamiento con MsCl seguido por NaOH en EtOH. El tratamiento de un compuesto **11** con DAST en cloruro de metileno con temperatura de reflujo en la presencia de piridina proporcionó 3'-fluoronucleósido (**12**, X = F). 3'-Azidonucleósido (**12**, X = N₃) se obtuvo mediante el tratamiento de **11** con cloruro de mesilo en cloruro de metileno en la presencia de trietilamina, seguida por NaN₃ en DMF. Los productos finales, 4'-C-etinil-FLT (**1a**, R¹ = F, R² = OH, R³ = etinilo) y 4'-C-etinil-AZT (**1a**, R¹ = N₃, R² = OH, R³ = etinilo) se obtienen mediante el tratamiento de **12** con 80% ácido acético.

Alternativamente, la reacción de **10** con MsCl en la presencia de base, tal como trietilamina y similares, seguida por el tratamiento del mesilato resultante con una base, tal como DBU o DBN o similares, produjo el intermedio **11'**. El tratamiento de **11'** con NaN₃ o fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) proporcionaron igualmente el mismo intermedio **12** con X = N₃ o X=F, respectivamente, como se divulga en Maillard, M. et al. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1955-1958. Los inventores, a modo de ejemplo, no pretenden quedar limitados a la timidina ya mencionada, e incorporan por referencia las divulgaciones de US 6,949,522; US 6,403,568; y US 2005/0009737, cada una de las cuales divulga ejemplos de purinas y pirimidinas que se contemplan.

2. Ejemplo no limitante de la síntesis de 4'-C-etinil-3'-fluoro- y 3'-azido-2',3'-dideoxinucleósidos (véase Figura 3)

El tratamiento de un compuesto **13** con cloruro de t-butildimetilsililo en cloruro de metileno en la presencia de imidazol, seguido por el retiro de un grupo protector clorobenzoilo con amoniaco metanólico produjo el compuesto **15**. La oxidación del **15** con DCC en DMSO en la presencia de trifluoroacetato de piridinio proporcionó el **16** luego de la purificación cromatográfica de columna en gel de sílice. El tratamiento de un compuesto **16** con formaldehído acuoso en una mezcla de 1,4-dioxano en agua en la presencia de 2N NaOH, seguido por reducción del intermedio resultante con NaBH₄ proporcionó el diol **17**. La protección selectiva con DMTrCl, seguido por oxidación con DCC en DMSO en la presencia de trifluoroacetato de piridinio produjo un aldehído **19**. La reacción de **19** con reactivo de Wittig clorometileno, seguido por la eliminación en la presencia de butil litio proporcionó 4'-C-etinil-xilofuranósido **20**. La acetólisis de **20** con

anhídrido acético en ácido acético en la presencia de ácido sulfúrico concentrado proporcionó el tetraacetato **21**. El acoplamiento de **21** con bases tratadas con sililo *silylated bases* en la presencia de ácido de Lewis, tal como TMSOTf o SnCl_4 , seguido por desprotección con amoníaco metabólico proporcionó los 4'-C-etinil-xilofuranosil-nucleósidos **23**. El tratamiento de un compuesto **23** con acetona en la presencia de una cantidad catalítica de HCl produjo el compuesto **24**. El compuesto **24** se sometió a la desoxigenación de Barton para proporcionar los 2'-deoxinucleósidos **25**.

La desisopropilenación de **25** con 80% de ácido acético, seguida por la protección selectiva con BzCl en piridina proporcionó los nucleósidos **27**. El tratamiento de un compuesto **27** con DAST en cloruro de metileno a temperatura de reflujo, seguida por desprotección con amoníaco metabólico proporcionó los 4'-C-etinil-nucleósidos finales (29, $\text{R}^1 = \text{F}$). El tratamiento de **27** con cloruro de metanosulfonilo en cloruro de metileno en la presencia de trietilamina, seguida por la reacción del mesilato resultante con NaN_3 en DMF produjo los 4'-C-etinil-nucleósidos (29, $\text{R}^1 = \text{N}_3$).

Los esquemas sintéticos divulgados anteriormente proveen los siguientes compuestos contemplados que incluyen, pero no se limitan a: un 4'-C-sustituido-3'-fluoro-2',3'-dideoxinucleósido, un 4'-C-sustituido-3'-azido-2',3'-dideoxinucleósido, un 4'-C-etinil-3'-fluoro-2',3'-dideoxinucleósido, un 4'-C-etinil-3'-azido-2',3'-dideoxinucleósido, una 4'-C-etinil-3'-fluoro-3'-deoxitimidina, y una 4'-C-etinil-3'-azido-3'-deoxitimidina.

Los nucleósidos antivíricamente activos pueden administrarse como cualquier derivado que, luego de la administración al anfitrión destinatario, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el compuesto precursor, o que exhibe él mismo actividad. Ejemplos no limitantes incluyen las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables (alternativamente denominadas "sales fisiológicamente aceptables").

Las modificaciones del compuesto activo, específicamente en las posiciones N^4 y 5'-O, pueden afectar la biodisponibilidad y la velocidad del metabolismo de la especie activa, proporcionando en esa forma control sobre la entrega de la especie activa. Además, las modificaciones pueden afectar la actividad antivírica del compuesto, aumentando en algunos casos la actividad sobre el compuesto precursor. Esto puede evaluarse fácilmente preparando el derivado y analizando su actividad antivírica de acuerdo con los métodos descritos en esta solicitud, u otros métodos conocidos por los expertos en el arte.

10

Los inventores de la presente solicitud contemplan además el uso de una cantidad antivíricamente efectiva de cualquiera de los compuestos divulgados en este documento o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable.

Sales y Profármacos Farmacéuticamente Aceptables

El término "sal farmacéuticamente aceptable o profármaco" se usa de principio a fin de la especificación para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto que, luego de la administración a un paciente, proporciona el compuesto activo.

Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. En casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales básicas o ácidas no tóxicas, puede ser apropiada la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Sales apropiadas incluyen las derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en el arte farmacéutico. En particular, ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico, formadas con ácidos, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, pero no limitadas a, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. Asimismo pueden formarse sales inorgánicas apropiadas, incluidas, sales sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse empleando procedimientos estándar bien conocidos en el arte, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido apropiado que proporcione un anión fisiológicamente aceptable. Pueden elaborarse igualmente sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metal alcalinotérreo (por ejemplo calcio) de ácido carboxílicos.

Profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza en el anfitrión para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en una fracción funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden oxidarse, reducirse, aminarse, desaminarse, hidroxilarse, deshidroxilarse, hidrolizarse, deshidrolizarse,

alquilarse, desalquilarse, acilarse, desacilarse, fosforilarse, y/o desfosforilarse para producir el compuesto activo.

Cualquiera de los nucleósidos descritos en esta solicitud puede administrarse como un profármaco nucleótido para aumentar la actividad, la biodisponibilidad, la estabilidad, o para alterar en otra forma las propiedades del nucleósido. En general, la alquilación, acilación u otra modificación lipófila del mono-, di- o trifosfato del nucleósido aumentará la estabilidad del nucleótido. Ejemplos de grupos radicales que pueden reemplazar uno o más hidrógenos en la fracción fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluidos azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos se describen en R. Jones y N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Cualquiera de éstos puede usarse en combinación con los nucleósidos divulgados para obtener el efecto deseado.

En varias incorporaciones, profármacos del derivado nucleósido, en los cuales R^1 es F o N_3 , descritos aquí, implican la sustitución en el carbono 5' (R^2) con: OH, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$, $P_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$, $OCH_2P_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$, $OP(O)(OQ)_a(NHR^4)_b$, SH, SR^4 , $SC(O)R^4$, NH_2 , $NHC(O)R^4$, NHR^4 , NR^4R^5 , $NHOH$, $NHOR^4$, $NHNH_2$, NR^4NH_2 , o $NHNHR^4$. R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alqueno inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo, tal como fenilo o bencilo sustituido o no sustituido; M es por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por H^+ , Na^+ , y K^+ ; v tiene un valor de 1, 2, ó 3; x, y, y z son independientes uno de otro y tienen un valor de 0, 1, 2, 3, ó 4; y a tiene un valor de 0 ó 1, b tiene un valor de 1 ó 2, y Q es M ó R^4 . Los inventores son conscientes de que una persona de habilidad ordinaria debe estar en capacidad de reconocer que para los fosfatos y fosfonatos representados anteriormente, cuando v es 1 la suma de x, y, y z es 2; cuando v es 2, la suma de x, y, y z es 3; y cuando v es 3, la suma de x, y, y z es 4.

Los fosfatos ($OP_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$) comprenden mono- ($v = 1$), di- ($v = 2$), y trifosfatos ($v = 3$) en forma de ácido, sal, o éster, incluidas sus combinaciones. En el caso donde $v = 2$, el nucleósido se sustituye en la posición 5'-C por un R^2 que tiene la siguiente estructura: $OP_2O_6M_xR^4_yR^5_z$, donde x, y, y z tienen los significados definidos más arriba. Una persona de habilidad ordinaria reconocerá que la forma de ácido puro se representa por ($OP_2O_6H_3$); la forma de sal pura se representa por ($OP_2O_6M_3$, M = Na^+ , K^+ , o ambos, Na^+ y K^+); y la forma de éster puro se representa por ($OP_2O_6R^4_yR^5_z$, en la cual, como ya se anotó, R^4 y R^5 pueden ser los mismos o diferentes y que, si diferente, la suma de y y z no excede de 3). Por supuesto, se contempla asimismo que los fosfatos puedan estar en una forma mixta. Por una

forma mixta se entiende que la fracción fosfato puede ser un ácido (cuando $M = H^+$), una sal (cuando $M = Na^+$ o K^+ ; o incluso Ca^{2+}), o un éster (en el que cualquiera o ambos de y y z de R^4 y R^5 tienen valores distintos de cero). Sin limitación, a modo de ejemplo, las siguientes estructuras representan ejemplos preferidos de fosfatos contemplados: OPO_3H_2 , $OP_2O_6H_3$, $OP_3O_9H_4$, OPO_3Na_2 , $OPO_3R^4R^5$, $OP_2O_6Na_3$, $OP_2O_6R^4_2R^5$, $OP_3O_9Na_4$, $OP_3O_9R^4_3R^5$, PO_3H_2 , $P_2O_6H_3$, $P_3O_9H_4$, PO_3Na_2 .

Se contempla que R^4 , R^5 , o ambos, R^4 y R^5 pueden tener la siguiente fórmula: $R^6C(O)OR^7$, en la cual R^6 es un alquilo, tal como alquilo inferior, y R^7 es un alquilenos inferior (tal como metileno, etileno, propileno, y butileno, el cual puede sustituirse o no sustituirse (con un hidroxialquilo, alcoxialquilo, o haloalquilo), siempre que R^7 se una al oxígeno fosfoéster. Sin limitarse por le ejemplo, se contempla que el nucleósido se sustituya en la posición 5'-C por una fracción que tenga la siguiente estructura: $OP(O)[OCH_2OC(O)C(CH_3)_3]_2$.

La unión de la posición 5'-C con el P de una fracción ($P_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$) da origen a mono- ($v = 1$), di- ($v = 2$), o tri-fosfonatos ($v = 3$), con formas ácido, sal, o éster, incluidas sus combinaciones. En el caso donde $v = 1$, el nucleósido se sustituye en la posición 5'-C por un R^2 representado por ($PO_3M_xR^4_yR^5_z$). Una persona de habilidad ordinaria reconocerá que la forma ácido puro se representa por (PO_3H_2); la forma sal pura se representa por (OPO_3M_2 , $M = Na^+$, K^+ , o ambos, Na^+ y K^+); y la forma éster puro se representa por ($OPO_3R^4_yR^5_z$, en la cual, como ya se anotó, R^4 y R^5 pueden los mismos o diferentes y que, si diferente, la suma de y y z no excede de 2). Por supuesto, se contempla también que los fosfonatos puedan estar en una forma mixta. Por una forma mixta se entiende que la fracción fosfonato puede ser un ácido (cuando $M = H^+$), una sal (cuando $M = Na^+$ o K^+ ; o incluso Ca^{2+}), o un éster (en el que cualquiera de los dos de y y z de R^4 y R^5 tienen valores diferentes de cero). Sin limitación, a modo de ejemplo, los siguientes ejemplos preferidos de radicales R^2 dan lugar a fosfonatos contemplados: PO_3H_2 , $P_2O_6H_3$, $P_3O_9H_4$, PO_3Na_2 , $P_2O_6Na_3$, $P_3O_9Na_4$, $PO_3R^4R^5$, $P_2O_6R^4_2R^5$, $P_3O_9R^4_3R^5$.

Adicionalmente, los inventores contemplan profármacos de los derivados nucleósido que implican la sustitución en el carbono 5' con fosforamidatos ($OP(O)(OQ)_a(NHR^4)_b$), en la cual a tiene un valor de 0 ó 1, b tiene un valor de 1 ó 2, y Q es M o R^4 .

El nucleósido activo puede proporcionarse igualmente como un lípido 5'-fosfoéster o un lípido 5'-éter, como se divulga en las siguientes referencias, las cuales se incorporan en esta solicitud por referencia: Kucera, L.S., et al. 1990.

AIDS Rex Hum. Retro Viruses. 6:491- 501; Piantadosi, G., et al. 1991. *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K.Y., et al. 1992, *Antim. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hosetler, K.Y., et al.1990, *J Biol. Chem.* 265:61127.

Ejemplos no limitantes de patentes de los Estados Unidos que divulgan radicales lipófilos apropiados que pueden incorporarse covalentemente en el nucleósido, preferiblemente en la posición 5'-OH del nucleósido o preparaciones lipófilas, incluyen las Patentes de los Estados Unidos No. 5,149,794; 5,194,654; 5,223,263; 5,256,641; 5,411,947; 5,463,092; 5,543,389; 5,543,390; 5,543,391; y 5,554,728, todas las cuales se incorporan en esta solicitud por referencia. Solicitudes extranjeras de patente que divulgan radicales lipófilos que pueden unirse a los nucleósidos de la presente invención, o preparaciones lipófilas, incluyen WO 89/02733, WO 90100555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, y WO 91/19721.

Composiciones Farmacéuticas

Composiciones farmacéuticas basadas en un compuesto nucleósido de fórmula (I) y (II) o su sal o profármaco farmacéuticamente aceptable pueden prepararse en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar una infección vírica por HBV o HIV o proliferación celular anormal, opcionalmente en combinación con un aditivo, sustancia portadora o excipiente farmacéuticamente aceptable. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con la infección o afección a tratarse, su gravedad, el régimen de tratamiento a emplearse, la farmacocinética del agente usado, así como el paciente tratado.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, el compuesto se formula preferiblemente en mezcla con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en forma administrable oralmente, pero las formulaciones pueden administrarse por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea, mediante supositorio o cualquier otra ruta. Las formulaciones intravenosas e intramusculares se administran preferiblemente en solución salina estéril. Una persona de habilidad ordinaria en el arte puede modificar la formulación dentro de las enseñanzas de la especificación para proporcionar numerosas formulaciones para una ruta particular de administración sin hacer inestables las composiciones de la presente invención o comprometer su actividad terapéutica. En particular, una modificación de un compuesto deseado para hacerlo más soluble en agua u otro vehículo, por

ejemplo, puede llevarse a cabo fácilmente mediante una modificación rutinaria (formulación de sal, esterificación, etc.).

En ciertas presentaciones farmacéuticas, se prefiere la forma profármaco del compuesto, incluidos especialmente derivados acilados (acetilados u otros) y derivados éter, ésteres de fosfato y varias formas de sal de los presentes compuestos. Una persona de habilidad ordinaria en el arte reconocerá cómo modificar fácilmente el presente compuesto en una forma profármaco para facilitar la administración del compuesto activo a un sitio específico ("**a targeted site**") dentro del organismo anfitrión o paciente. El profesional experto sacará asimismo ventaja de los parámetros farmacocinéticos favorables de la forma profármaco, donde sea aplicable, en administrar el compuesto deseado a un sitio específico dentro del organismo anfitrión o paciente para maximizar el efecto previsto del compuesto en el tratamiento de infecciones víricas por HBV y HIV.

La cantidad de compuesto incluido dentro de las formulaciones terapéuticamente activas, de acuerdo con la presente invención, es una cantidad efectiva para tratar la infección o afección, en incorporaciones preferidas, una infección vírica por HBV o HIV. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva del presente compuesto en una presentación farmacéutica varía habitualmente desde alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg o más, y todos los valores y sub-rangos entre ellos, dependiendo del compuesto empleado, la afección o infección y la vía de administración. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad profiláctica o preventivamente efectiva de las composiciones, de acuerdo con la presente invención, cae dentro del mismo rango de concentración expuesto más arriba para una cantidad terapéuticamente efectiva y es usualmente la misma que una cantidad terapéuticamente efectiva.

La administración del compuesto activo puede variar desde una administración continua (suero intravenoso) a varias administraciones orales por día (por ejemplo, Q.I.D., B.I.D., etc.) y puede incluir la administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente promotor de la penetración), bucal y en forma de supositorio, entre otras vías de administración. Pueden emplearse además tabletas orales gastrorresistentes para aumentar la biodisponibilidad y la estabilidad de los compuestos de una vía oral de administración. La presentación farmacéutica más efectiva dependerá de la farmacocinética del agente particular elegido, así como la gravedad de la enfermedad en el paciente. Las presentaciones farmacéuticas orales son particularmente preferidas, debido a la facilidad de administración y el potencial cumplimiento terapéutico favorable por parte del paciente. Para

preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención se mezcla preferiblemente con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas convencionales de composición farmacéutica para producir una dosis. Una sustancia portadora puede adoptar una amplia variedad de formas, dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. En la preparación de composiciones farmacéuticas en presentación farmacéutica oral, pueden emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales. En consecuencia, para preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, elixires y soluciones, pueden utilizarse sustancias portadoras y aditivos apropiados incluidos agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, preservantes, agentes colorantes y similares. Para preparaciones orales sólidas tales como polvos, tabletas, cápsulas, y para preparaciones sólidas tales como supositorios, puede utilizarse sustancias portadoras y aditivos apropiados incluidos almidones, sustancias portadoras de azúcar, tales como dextrosa, manitol, lactosa y sustancias portadoras relacionadas, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desagregantes y similares. Si se desea, las tabletas o cápsulas pueden ser gastrorresistentes para liberación sostenida mediante técnicas estándar. El uso de estas presentaciones farmacéuticas puede impactar significativamente la biodisponibilidad de los compuestos en el paciente.

Para formulaciones parenterales, la sustancia portadora comprenderá usualmente agua esterilizada o solución de cloruro de sodio acuoso, aunque pueden incluirse otros ingredientes, como aquellos que contribuyen a la dispersión. Donde hay que usar agua esterilizada y mantenerse esterilizada, las composiciones y sustancias portadoras tienen también que ser esterilizadas. Pueden prepararse asimismo suspensiones inyectables, caso en el cual pueden usarse sustancias portadoras líquidas apropiadas, agentes de suspensión y similares.

En igual forma pueden prepararse suspensiones liposómicas (incluidos liposomas dirigidos a antígenos víricos) por métodos convencionales para producir sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para la administración de nucleósidos libres, nucleósidos acilo o formas profármaco éster de fosfato de los compuestos nucleósido de acuerdo con la presente invención.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en combinación o alternación con uno o más agentes antivíricos, anti-HBV, anti-HIV o interferón, anti-bacterianos, incluidos otros compuestos de la presente invención. Ciertos compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser efectivos para mejorar la actividad biológica de ciertos agentes de acuerdo con la presente invención reduciendo el metabolismo, catabolismo o inactivación de otros compuestos y como tales, se co-administran para este efecto previsto.

Terapia de Combinación o Alternación

En otra incorporación, para el tratamiento, inhibición, prevención y/o profilaxis de infección vírica, el compuesto activo o su derivado o sal pueden administrarse en combinación o alternación con otro agente antivírico. En general, en la terapia de combinación, posologías efectivas de dos o más agentes se administran conjuntamente, mientras que durante la terapia de alternación, se administra en serie una dosificación efectiva de cada agente. La posología dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos por los expertos en el arte. Hay que anotar que los valores de dosificación variarán igualmente con la gravedad de la enfermedad a aliviar. Hay que entender además que para cualquier sujeto particular, regímenes y pautas posológicas específicas deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Ejemplos no limitantes de agentes antivíricos que pueden emplearse en combinación con los compuestos divulgados en esta solicitud incluyen, pero no se limitan a, aciclovir (ACV), ganciclovir (GCV o DHPG) y sus profármacos (por ejemplo, valil-ganciclovir), E-5- (2-bromovinil)-2'-deoxiuridina (BVDU), (E)-5-vinil-1- β -D-arabinosiluracil (VaraU), (E)-5-(2-bromovinil)-1- β -D-arabinosiluracil (BV-araU), 1-(2-deoxi-2-fluoro- β -D-arabinosil)-5-yodocitosina (D-FIAC), 1-(2-deoxi-2-fluoro- β -L-arabinosil)-5-metiluracil (L-FMAU), (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxiipropil) adenina [(S)-HPMPA], (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxiipropil)-2,6-diaminopurina [(S)-HPMPDAP], (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxiipropil) citosina [((S)-HPMPC, o cidofovir], y (2S, 4S)-1-[2-(hidroximetil)-1,3-dioxolan-4-il]-5-yodouracil (L-5-IoddU), FTC, entecavir, interferón- α , interferón- α pegilado, lamivudina (3TC), LdT (o su profármaco), LdC (o su profármaco), y adefovir, inhibidores de proteasa (Agenerase, Crixivan, Fortovase, Invirase, Kaletra, Lexiva, Norvir, Reyataz,

Aptivus y Viracept), e inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósido (Rescriptor, Sustiva y Viramune).

Otros ejemplos no limitantes de agentes antivíricos que pueden usarse en combinación con los compuestos divulgados en esta solicitud incluyen, pero no se limitan a, el (-)-enantiómero de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatolano [(-)-FTC]; el (-)-enantiómero de 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatolano (3TC); carbovir, aciclovir, interferón, famciclovir, penciclovir, AZT, DDI, DDC, L-(-)-FMAU, y D4T.

Sin pretender limitar el ámbito de la invención, métodos ejemplares y sus resultados relacionados de acuerdo con las incorporaciones de la presente invención se dan a continuación. Nótese que los títulos o subtítulos pueden emplearse en los ejemplos para conveniencia de un lector, lo cual no debe limitar el ámbito de la invención en forma alguna. Más aún, ciertas teorías se proponen y divulgan en esta solicitud; sin embargo, en ningún modo, independientemente de si son correctas o erróneas, limitan el ámbito de la invención en la medida en que los datos se procesan, recolectan, convierten, o similares, de acuerdo con la invención sin importar ninguna teoría particular o esquema de acción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de 4'-C-etiniltimidina.

4'-C-Etiniltimidina se prepara de acuerdo con métodos de la literatura. (Nomura, M et al. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2901-2908; and Ohru, H. et al. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4516-4525).

Ejemplo 2. Preparación de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)timidina (10, FIG. 2).

A una solución de 4'-C-etiniltimidina (1 mmol) en piridina (10 ml) se agrega cloruro de dimetoxitritilo (1.2 mmol) a 0 °C y la solución resultante se agita a temperatura de la sala durante 3 horas. Se agrega EtOAc (100 mL) y la solución se lava con agua y se seca (Na₂SO₄). Se evapora el disolvente a sequedad bajo presión reducida. El residuo se co-evapora con tolueno (2 x 20 mL) y se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5% MeOH en cloruro de metileno) para proporcionar 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)timidina (10).

Ejemplo 3. Preparación de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-2,3'- anhidrotimidina (11', FIG. 2).

A una solución de 10 (1 mmol) en cloruro de metileno (20 mL) se agregan trietilamina (1 mL) y cloruro de metanosulfonilo (1.2 mmol) y la solución se agita a

temperatura de la sala durante 16 horas. Se agrega EtOAc (50 mL) y la mezcla se lava con agua y se seca (Na_2SO_4). Se retira el disolvente y el residuo se disuelve en tetrahidrofurano anhidro (THF, 20 mL). A la solución se agrega DBU (3 mmol) y la solución resultante se hace refluir durante 16 horas. La solución se diluye con EtOAc (50 mL) y se lava con salmuera. Se seca la solución orgánica (Na_2SO_4) y se retira el disolvente y el residuo se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (2% MeOH en cloruro de metileno) para proporcionar el compuesto 11'.

Ejemplo 4. Preparación de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-azido-3'-deoxitimidina (12, X= N_3 , FIG. 2).

A una solución de 11' (1 mmol) en DMF seco (10 mL) se agrega NaN_3 (3 mmol) y la mezcla se agita a 100 °C durante 16 horas. Se evapora el disolvente a sequedad bajo presión reducida. El residuo se co-evapora con tolueno (2 x 20 mL) y se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (20-50% EtOAc en hexanos) para proporcionar 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-azido-3'-deoxitimidina (12, X= N_3).

Ejemplo 5. Preparación de 4'-C-etinil-3'-azido-3'-deoxitimidina (1a, X= N_3 , FIG. 2).

Una solución de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-azido-3'-deoxitimidina (12, X= N_3) (1mmol) en una solución de ácido trifluoroacético al 1% en cloruro de metileno (20 mL) se agita a temperatura de la sala durante 3 horas y se neutraliza con hidróxido de amonio. Se evapora el disolvente a sequedad bajo presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (2-5% MeOH en cloruro de metileno) para producir 4'-C-etinil-AZT (1a, X= N_3).

Ejemplo 6. Preparación de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-fluoro-3'-deoxitimidina (12, X=F, FIG. 2).

A una solución de 11' (1 mmol) en DMF seco (10 mL) se agrega fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF, 3 mmol) y la mezcla se agita a 100 °C durante 16 horas. Se evapora el disolvente a sequedad bajo presión reducida. El residuo se co-evapora con tolueno (2 x 20 mL) y se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (20-50% EtOAc en hexanos) para proporcionar 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-fluoro-3'-deoxitimidina (12, X=F).

Ejemplo 7. Preparación de 4'-C-etinil-3'-fluoro-3'-deoxitimidina (Ia, X=F, FIG. 2).

Una solución de 4'-C-etinil-5'-O-(dimetoxitritil)-3'-fluoro-3'-deoxitimidina (12, X=F) (1mmol) en una solución de ácido acético al 1% en cloruro de metileno (20 mL) se agita a temperatura de la sala durante 3 horas y se neutraliza con hidróxido de amonio. Se evapora el disolvente a sequedad bajo presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (2-5% MeOH en cloruro de metileno) para producir 4'-C-etinil-FLT (Ia, X=F).

Actividad Anti-HIV**Ejemplo 8. Método MTT Usando Células MT-4**

Un agente de prueba (100 μ L) se diluye en una microplaca de 96 pocillos. Células MT-4 infectadas con *HIV-1* (cepa III_b; 100 TCID₅₀) y células MT-4 no infectadas se agregan a la microplaca de modo que el número de células en cada pocillo sea de 10.000. Las células se cultivan a 37 °C durante cinco días. Se agrega MTT (20 μ L, 7.5 mg/ml) a cada pocillo, y las células se cultivan durante 2-3 horas más. Se muestrea el medio cultivado (120 μ L), y se agrega solución de terminación MTT (isopropanol que contiene 4% Triton X-100 y 0.04N HCl) a la muestra. Se agita la mezcla para formar formazano, el cual se disuelve. Se mide la absorbencia a 540 nm de la solución. Puesto que la absorbencia es proporcional al número de células viables, la concentración del agente de prueba, a la cual se mide un valor medio de la absorbencia en una prueba usando células MT-4 infectadas, representa EC₅₀, mientras que la concentración del agente de prueba, a la cual se mide un valor medio de la absorbencia en una prueba usando células MT-4 no infectadas, representa CC₅₀.

Ejemplo 9. Análisis MAGI Usando Células HeLa CD4/LTR-beta-Gal

Células HeLa CD4/LTR-beta-Gal se agregan a 96 pocillos de modo que el número de células en cada pocillo sea de 10.000. Después de 12-24 horas, se retira el medio de cultivo, y se agrega un agente de prueba diluido (100 μ L). Se agregan una variedad de cepas HIV (cepa silvestre: WT, cepa resistente al fármaco: MDR, M184V, NL4-3, 104pre, y C; cada una equivalente a 50 TCID₅₀), y las células se cultivan durante 48 horas más. Las células se fijan durante cinco minutos usando PBS que contiene 1% formaldehído y 0.2% glutaraldehído. Luego de lavar las células fijadas con PBS tres veces, las células se colorean con 0.4 mg/ml X-Gal durante una hora, y se cuenta el número de células coloreadas de azul de cada pocillo bajo un microscopio estereoscópico de transmisión. La

concentración del agente de prueba a la cual las células coloreadas de azul disminuyen a 50% y 90% en número representó EC_{50} y EC_{90} , respectivamente. En una manera similar a la empleada en el método MTT, se mide la citotoxicidad mediante el uso de células HeLa CD4/LTR-beta-Gal.

Actividad Anti-HBV

Ejemplo 10. Análisis Anti-HBV AD38

Se establece una línea de células A HepG2 — AD38 en un medio de cultivo que contenía DMEM - F/12, 10% suero fetal bovino, 100 IU/mL / 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 50 µg/mL kanamicina, 0.3 µg/mL tetraciclina y 200 µg/mL G418. El medio de análisis para la línea de células HepG2 - AD38 contiene RPMI- 1640, 10% suero fetal bovino, 100 IU/mL / 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 50 µg/mL kanamicina y 200 µg/mL G418. Otros materiales utilizados para este análisis son los siguientes: solución salina amortiguada con fosfato (PBS), placas bio-recubiertas de 96 pocillos, DNeasy 96 tissue kit (Qiagen), QIAvac 96 vacuum manifold, placas de reacción de 96 pocillos Micro amp optical (Applied Biosystems), Micro amp optical caps (Applied Biosystems), Tagman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 7700 Sequence detector (Applied Biosystems), y cebador y sonda para HBV DNA: 1125 nM cebador directo (cebador 1), GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA; 1125 nM cebador inverso (cebador 2), GAG AGA AGT CCA CCA CGA GTC TAG A; y 250 nM sonda, FAM-TGT TGA CAA GAA TCC TCA CAA TAC CAC.

Metodología

Análisis de Células. Se siembran pocillos de una placa bio-recubierta de 96 pocillos con la cantidad apropiada de células, tal como 5×10^4 células/pocillo, y se incuban a 37 °C con 5% CO_2 . Después de 2 días, se retira cuidadosamente el sobrenadante, y la capa de células se lava con PBS, y se renueva posteriormente con medio de análisis, con o sin compuestos de prueba, en una cantidad apropiada (tal como 10 µM o en una respuesta - dosis con una relación de 1:3 comenzando en 10 µM. Las muestras se someten a prueba en duplicado. Se dejan crecer las células durante 5 días más, en los cuales el día 7, se recoge una cantidad de sobrenadante, tal como 180 µL, y se almacena en un recipiente apropiado (tal como en un recipiente *blue rack* incluido en el DNeasy 96 tissue kit a -80 °C o a temperatura de la sala dependiendo de si el paso de extracción tiene que realizarse o no inmediatamente o en algún momento posterior.

Extracción de ADN vírico HBV del sobrenadante celular. Las muestras de sobrenadante recogidas el día 7 se descongelan o se utilizan tal como están. Una

solución de trabajo amortiguador ATL/proteinasa K, que contiene 2 mL de proteinasa K y 18 mL de amortiguador ATL, se transfiere a la parte superior de las muestras de sobrenadante. Los tubos se sellan entonces y se mezclan mediante inversión repetida. A continuación los tubos se centrifugan, hasta 3.000 rpm, con el fin de recoger cualquier solución de las tapas, la cual se utiliza posteriormente y se denomina la solución de tapa ("**the cap solution**"). Los tubos se incuban a 55 °C durante 15 minutos, y luego se centrifugan de nuevo hasta 3.000 rpm. A cada muestra se agregan 410 µL de amortiguador AL/E. Los tubos se sellan otra vez, se ponen en un bastidor, y se agitan vigorosamente durante un período apropiado de tiempo (tal como, 15 segundos), y los tubos se centrifugan entonces hasta 3.000 rpm. En este punto la placa DNeasy 96 se pone encima del QIAvac 96 vacuum manifold. La solución de tapa se transfiere luego a la placa DNeasy 96, y se aplica vacío durante un período apropiado de tiempo. Se agrega a cada pocillo una cantidad de amortiguador AW1 (tal como 500 µL), y luego se aplica vacío nuevamente durante un periodo apropiado de tiempo (tal como alrededor de 1 minuto). A los pozos se agrega una cantidad de amortiguador AW2 (tal como 500 µL), y de nuevo se aplica vacío durante un período de tiempo (tal como 1 minuto). A continuación se agita el contenido de la solución en los pocillos, y luego se aplica vacío otra vez durante un período de tiempo (tal como 10 minutos). Se eluye el ADN agregando amortiguador AE pre-calentado a cada pocillo y agregando vacío posteriormente.

PCR en Tiempo Real.

Es necesario preparar suficientes cebadores HBV y solución de sonda para 200 pocillos (total 1500µL) empleando la siguiente solución que contiene 100 µM de cebador 1, 100 µM de cebador 2, 50 µM de sonda en agua libre de nucleasa. Es además necesario preparar una cantidad suficiente de mezcla de reacción que contiene Universal PCR Master Mix, los cebadores HBV y la solución de sonda, y agua libre de nucleasa. A cada pocillo de una placa de reacción óptica de 96 pocillos se agrega una cantidad apropiada de la mezcla de reacción y ADN HBV de cada muestra. Los pocillos se cubren con tapas ópticas y luego se centrifugan durante el periodo apropiado de tiempo. La placa se pone en un detector de secuencias (tal como un 7700 Sequence detector), y se selecciona el **reporter** para FAM, y el ajuste de volumen se selecciona para 25 µL. Se pone en funcionamiento la máquina y luego de un cierto período de tiempo (alrededor de 2

horas), se calculan para cada compuesto de prueba el dCt y la reducción en la carga vírica.

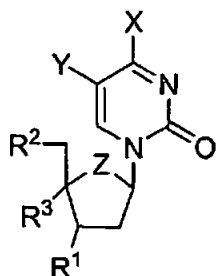
Ejemplo 11. Análisis de citotoxicidad el día 8

Líneas celulares HepG2 (hepáticas), BxPC3 (pancreáticas) y CEM (linfocíticas) se establecen en medio de cultivo apropiado. Por ejemplo, el medio de cultivo para la línea de células HepG2 contiene DMEM, 10% de suero fetal bovino, y 100 IU/mL / 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. El medio de análisis para BxPC3 y CEM contiene RPMI-1640, 10% suero fetal bovino, y 100 IU/mL / 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina.

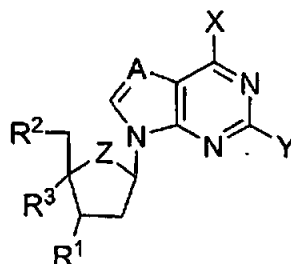
Metodología. Una cantidad de diluciones 2X de fármaco se agregan a los pocillos de una placa de 96. Se agregan 50 µL de diluciones 2X de fármaco en una placa de 96 pocillos. En cada análisis, se utiliza un control "sin fármaco" (medio únicamente) para determinar los valores de absorbencia mínima y un control "células + medio únicamente" para el valor de absorbencia máxima. Se emplea igualmente un control disolvente si el fármaco se disuelve en DMSO. Las células se cuentan y re-suspenden en el medio de análisis apropiado. Se anota que las células deben agregarse con 2.000 células por pocillo. Se agregan nuevas suspensiones de células a cada pocillo y la placa se incuba a 37 °C con 5% CO₂ durante 8 días. Luego de 8 días de incubación, se agrega colorante MTS a cada pocillo y la placa se incuba durante 2 horas a 37 °C con 5% CO₂. Las placas se leen entonces utilizando un lector de placas ELISA con una longitud de onda de 490 nm. Se calcula la absorbencia de los pocillos de control con medio únicamente. Se determina el valor de inhibición del 50% (CC₅₀) comparando la absorbencia en los pocillos de control de células sin fármaco con la absorbencia en los pocillos que contienen células y fármaco de prueba.

REIVINDICAMOS:

1. Un compuesto que comprende un β -D- y β -L-nucleósido o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable, que tiene la estructura definida por la fórmula (I) o por la fórmula (II) :



(I)



(II)

en donde:

X es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH, SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, o CF_3 ;

Y es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH, SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, CF_3 , hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R^1 es F o N_3 ;

R^2 es OH, OR^4 , OC(O)R^4 , $\text{OP}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{P}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OCH}_2\text{P}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OP(O)(OQ)}_a(\text{NHR}^4)_b$, SH, SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, SC(O)R^4 , NH_2 , NHC(O)R^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 ;

R^3 es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluorovinilo, alquilo (C_{1-6}), uno a tres alquilo (C_{1-6}) sustituido con halógeno, alquenilo (C_{1-6}) o alquinilo (C_{1-6}), siempre que cuando R^1 es N_3 , R^3 no es hidroximetilo;

Z es O, S, CH_2 o $\text{C}=\text{CH}_2$;

A es N, CH, o CF; y

R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alquenilo inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo;

M es por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por H^+ , Na^+ , y K^+ ;

v tiene un valor de 1, 2, ó 3;

x, y, y z son independientes uno de otro y tienen un valor de 0, 1, 2, 3, ó 4; y

a tiene un valor de 0 ó 1, b tiene un valor de 1 ó 2, y Q es M o R⁴.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es un 4'-C-sustituido-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleósido.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es un 4'-C-sustituido-3'-azido-2',3'-dideoxynucleósido.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es un 4'-C-etinil-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleósido.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es un 4'-C-etinil-3'-azido-2',3'-dideoxynucleósido.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es un 4'-C-etinil-3'-fluoro-3'-deoxitimidina.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el nucleósido es una 4'-C-etinil-3'-azido-3'-deoxitimidina.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un excipiente o diluyente.

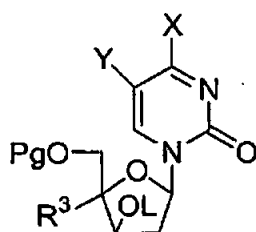
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y por lo menos uno de otros agentes antiviricos.

10. Un método para el tratamiento o profilaxis de un anfitrión infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otro agente.

11. Un método para el tratamiento o profilaxis de un anfitrión infectado con el virus de la hepatitis B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otro agente.

12. Uso de una cantidad antivíricamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o su sal y profármaco farmacéuticamente aceptable.

13. Un intermedio de la fórmula:



en donde

X es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH, SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, o CF_3 ;

Y es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH, SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH, OR^4 , N_3 , CN, CF_3 , hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R^3 es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluorovinilo, alquilo (C_{1-6}), uno a tres alquilo (C_{1-6}) sustituido con halógeno, alquenilo (C_{1-6}) o alquinilo (C_{1-6}) siempre que cuando R^1 es N_3 , R^3 no es hidroximetilo;

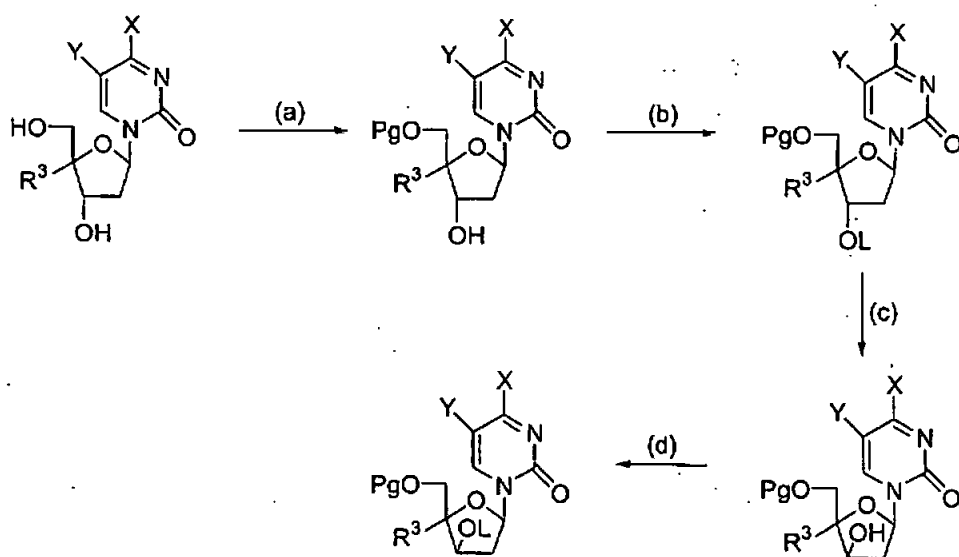
Pg es un grupo protector hidroxilo;

L es un grupo saliente; y

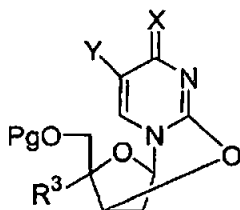
R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alquenilo inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo.

14. Un proceso para la preparación de un intermedio de la reivindicación 13, que comprende:

- (a): proteger selectivamente un 5'-OH con un grupo protector, Pg, para formar un grupo 5'-OPg;
- (b): activar un 3'-OH con un grupo saliente, L, para formar un grupo 3'-OL;
- (c): hacer reaccionar un 3'-C con una base hidróxido con el fin de convertir la posición 3'-C de una configuración ribo- a una configuración xilo;
- (d): activar un 3'-OH que tiene una configuración xilo con un grupo saliente, L, para formar un grupo 3'-OL.



15. Un intermedio de la fórmula:



en donde

X es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR⁴, NR⁴R⁵, NHOH, NHOR⁴, NHHN₂, NR⁴NH₂, NHHNR⁴, SH, SR⁴, S(O)R⁴, S(O)₂R⁴, OH, OR⁴, N₃, CN, o CF₃;

Y es hidrógeno, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR⁴, NR⁴R⁵, NHOH, NHOR⁴, NHHN₂, NR⁴NH₂, NHHNR⁴, SH, SR⁴, S(O)R⁴, S(O)₂R⁴, OH, OR⁴, N₃, CN, CF₃, hidroximetilo, metilo, etilo opcionalmente sustituido o no sustituido, vinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, 2-bromovinilo opcionalmente sustituido o no sustituido, etinilo opcionalmente sustituido o no sustituido;

R³ es F, ciano, azido, etinilo, clorovinilo, fluorovinilo, alquilo (C₁₋₆), uno a tres alquilo (C₁₋₆) sustituido con halógeno, alquenilo (C₁₋₆) o alquinilo (C₁₋₆) siempre que cuando R¹ es N₃, R³ no es hidroximetilo;

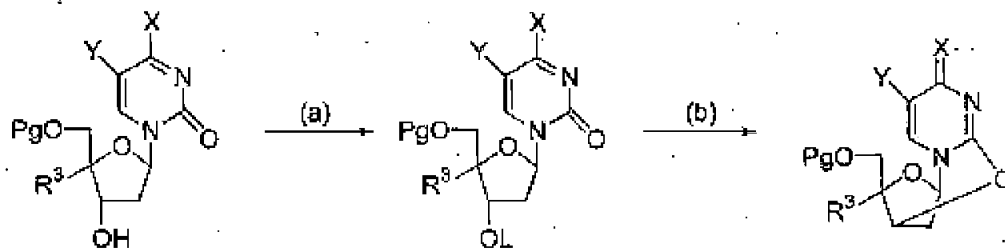
Pg es un grupo protector hidroxilo; y

R^4 y R^5 son los mismos o diferentes y son alquilo inferior, alqueno inferior, acilo de 1-17 carbonos, arilo, o aralquilo.

16. Un proceso para la preparación de un intermedio de la reivindicación 15, que comprende:

(a): activar un 3'-OH de un nucleósido 5'-O-protegido con un grupo saliente, L; para formar un grupo nucleósido 3'-OL-5'-O-protegido; seguido por

(b): tratar el nucleósido 3'-OL-5'-O-protegido con DBU o DBN; con el fin de obtener el intermedio;



en donde L se selecciona del grupo conformado por un sulfonilo, un trifluorosulfonilo, un sulfonato sustituido, y un sulfonato no sustituido.

FIGURA 2

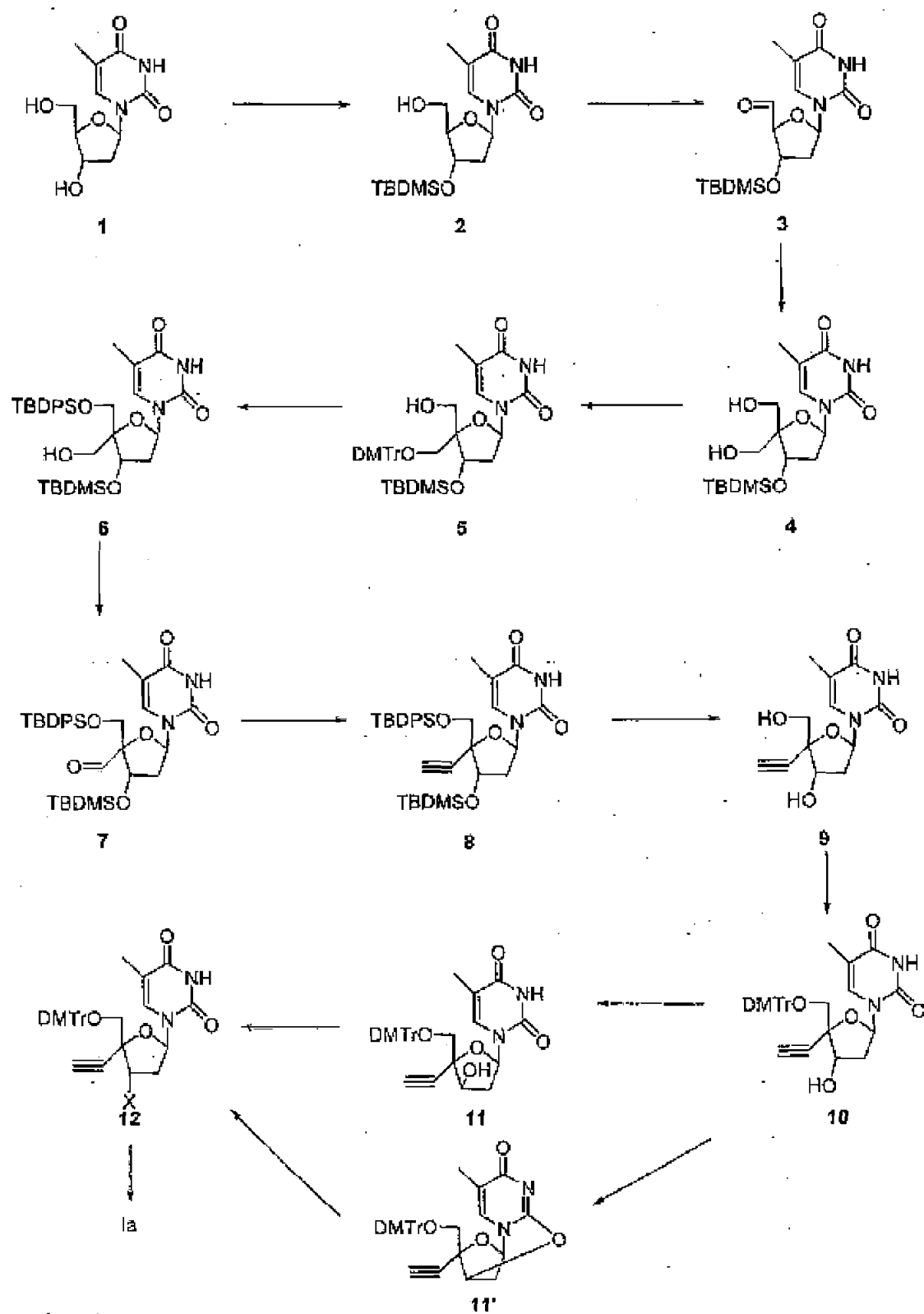
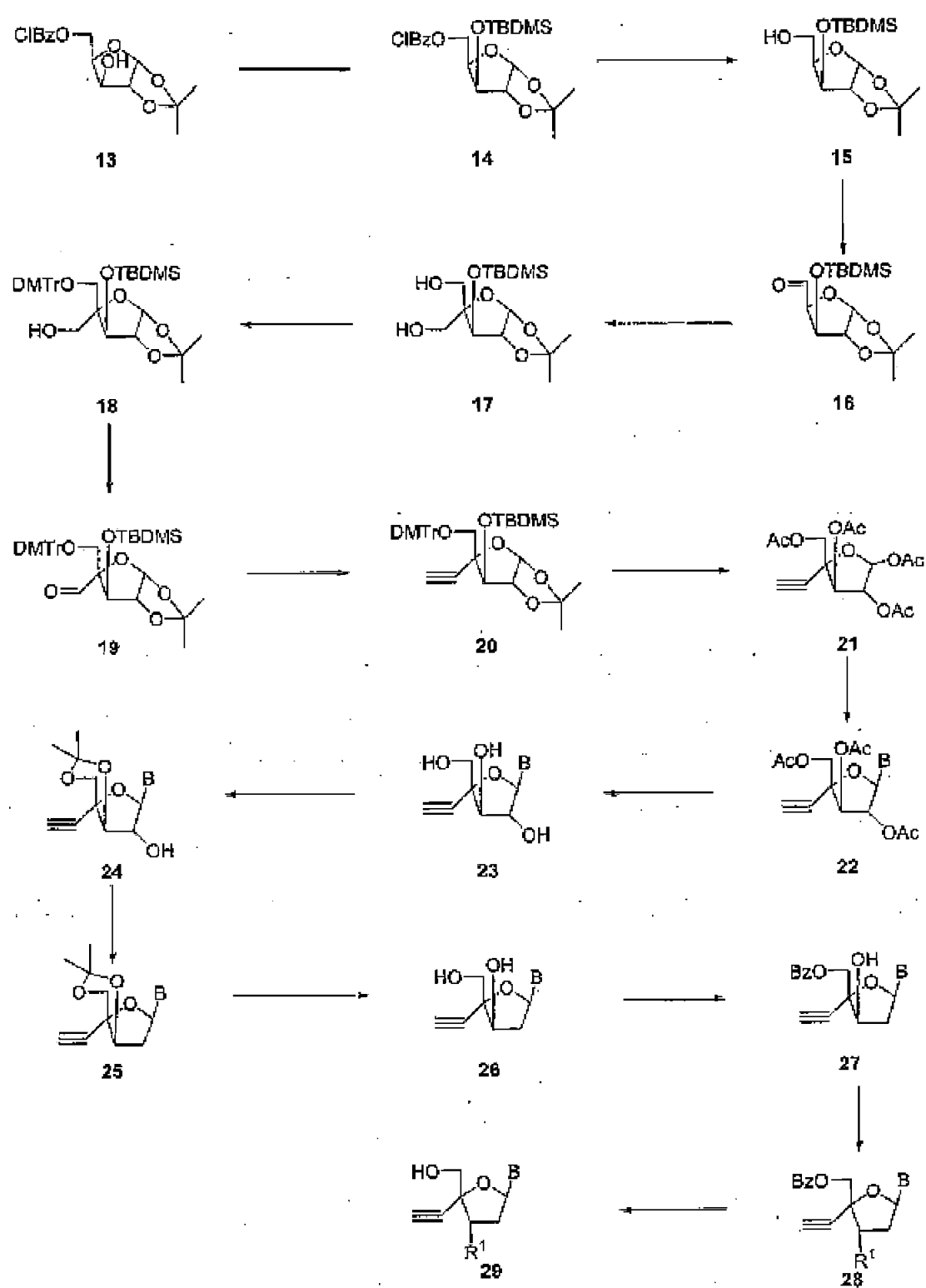


FIGURA 3



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



FOR PUBLICATION IN THE PCT GAZETTE

(43) International Publication Date
5 April 2007 (05.04.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/038507 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 31/7072 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/037470

(22) International Filing Date:
26 September 2006 (26.09.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/720,388 26 September 2005 (26.09.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PHARMASSET, INC. [US/US]; 303a College Road East, Princeton, NJ 08540 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DU, Jinfa [US/US]; 1206 Reins Circle, New Hope, PA 18938 (US). FURMAN, Philip [US/US]; 5 Quincy Court, Princeton, NJ 08540 (US). SOFIA, Michael [US/US]; 137 Washington Drive, Southington, CT 06489 (US).

(74) Agent: BRUESS, Steven, C.; Merchant & Gould P.C., P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (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, GH, GI, GM, GN, GU, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

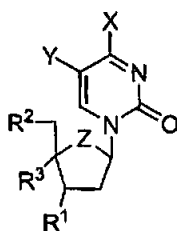
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

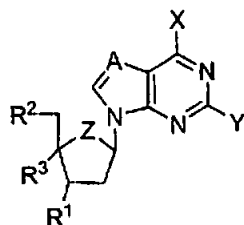
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODIFIED 4'-NUCLEOSIDES AS ANTIVIRAL AGENTS



(I)

(57) Abstract: Compounds, methods and compositions for treating a host infected with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus comprising administering an effective amount of a described 4'-C-substituted /3-D- and /3-L-nucleoside or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, are provided.



(II)

WO 2007/038507 A2

MODIFIED 4'-NUCLEOSIDES AS ANTIVIRAL AGENTS

This application is being filed on September 26, 2006 as a PCT International Patent application in the name of PHARMASSET, INC., a US national corporation, applicant for all countries except the US, and Jinfa Du, Phillip Forman, and Michael Sofia, all citizens of the U.S., applicants for the designation of the US only. This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/720,388, filed on September 26, 2005.

10 FIELD OF THE INVENTION

This invention is in the area of pharmaceutical chemistry, and is in particular, a compound, method and composition for treating a host infected with human immunodeficiency virus (referred to below as "HIV"), hepatitis B virus (referred to below as "HBV"), or both HIV and HBV comprising administering an effective amount of a described β -D- and β -L-4'-C-substituted-3'-fluoro- and 3'-azido-3'-deoxynucleoside or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

In 1981, acquired immune deficiency syndrome (AIDS) was identified as a disease that severely compromises the human immune system that almost without exception leads to death. In 1983, the etiological cause of AIDS was determined to be the HIV.

In 1985, it was reported that the synthetic nucleoside 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) inhibits the replication of HIV. Since then, a number of other synthetic nucleosides, including 2',3'-dideoxyinosine (DDI), 2',3'-dideoxycytidine (DDC), and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (D4T), have been proven to be effective against HIV. After cellular phosphorylation to the 5'-triphosphate by cellular kinases, these synthetic nucleosides are incorporated into a growing strand of viral DNA, causing chain termination due to the absence of the 3'-hydroxyl group. They can also inhibit the viral enzyme reverse transcriptase.

The success of various synthetic nucleosides in inhibiting the replication of HIV in vivo or in vitro has led a number of researchers to design and test nucleosides that substitute a heteroatom for the carbon atom at the 3'-position of the nucleoside (Norbeck et al. 1989, *Tetrahedron Letters*, 30 (46) 6246; European Patent Application Publication No. 0 337 713, and U.S. Pat. No. 5,041,449).

U.S. Pat. No. 5,047,407 and European Patent Application Publication No. 0 382 526, disclose a number of racemic 2'-substituted-5'-substituted-1,3-oxathiolane nucleosides with antiviral activity, and specifically report that the racemic mixture (about the C4'-position) of the C1'- β isomer of 2-hydroxymethyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oxathiolane ($\pm$)-BCH-189) has approximately the same activity against HIV as AZT, and no cellular toxicity at the tested levels. ($\pm$)-BCH-189 has also been found to inhibit the replication of AZT-resistant HIV isolates in vitro from patients who have been treated with AZT for longer than 36 weeks. The (-)-enantiomer of the isomer of BCH-189, known as 3TC, is highly potent against HIV and exhibits little toxicity. (-)-cis-2-hydroxymethyl-5-(5-fluorocytosin-1-yl)-1,3-oxathiolane ("FTC") also has potent HIV activity (Schinazi et al. 1992 *Antimicrob. Agent and Chemotherap.*, 2423-2431).

Recently, 4'-C-substituted nucleosides have been reported to show potent anti-HIV activity (Siddiqui, M. A. et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 5041-5048; Nomura, M. et al. J. Med. Chem. 1999, 42, 2901-2908).

Another virus that causes a serious human health problem is HBV. HBV is second only to tobacco as a cause of human cancer. The mechanism by which HBV induces cancer is unknown, although it is postulated that it may directly trigger tumor development, or indirectly trigger tumor development through chronic inflammation, cirrhosis, and cell regeneration associated with the infection.

After a two to six month incubation period in which the host is unaware of the infection, HBV infection can lead to acute hepatitis and liver damage that causes abdominal pain, jaundice, and elevated blood levels of certain enzymes. HBV can cause fulminant hepatitis, a rapidly progressive, often fatal form of the disease in which massive sections of the liver are destroyed.

In western industrialized countries, high-risk groups for HBV infection include those in contact with HBV carriers or their blood samples. The epidemiology of HBV is very similar to that of acquired immune deficiency syndrome, which accounts for why HBV infection is common among patients with AIDS or AIDS-related complex. However, HBV is more contagious than HIV. Both FTC and 3TC exhibit activity against HBV (Furman et al. 1992 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2686-2692).

A human serum-derived vaccine has been developed to immunize patients against HBV. While it has been found effective, production of the vaccine is

troublesome because the supply of human serum from chronic carriers is limited, and the purification procedure is long and expensive. Further, each batch of vaccine prepared from different serum must be tested in chimpanzees to ensure safety.

Vaccines have also been produced through genetic engineering. Daily treatments
5 with α -interferon, a genetically engineered protein, have also shown promise.

In light of the fact that acquired immune deficiency syndrome, AIDS-related complex, and hepatitis B virus have reached epidemic levels worldwide, and have tragic effects on the infected patient, there remains a strong need to provide new effective pharmaceutical agents to treat these diseases and that have low toxicity to
10 the host.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention discloses compounds, their synthesis, methods and compositions for treating a host infected with HIV, HBV, or both HIV and HBV
15 comprising administering an effective amount of a described β -D- and β -L-4'-C-substituted-3'-fluoro- and 3'-azido-3'-deoxynucleoside or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20 **FIG. 1** represents chemical structures of modified 4'-nucleosides as antiviral agents.

FIG. 2 is a nonlimiting illustrative example of the synthesis of 4'-C-ethynyl-3'-fluorothymidine (Ia, $R^1 = F$, $R^2 = OH$, $R^3 = \text{ethynyl}$) or 4'-C-ethynyl-3'-azidothymidine (Ia, $R^1 = N_3$, $R^2 = OH$, $R^3 = \text{ethynyl}$).

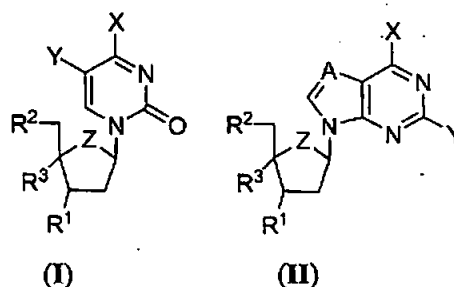
25 **FIG. 3** is a nonlimiting illustrative example of the synthesis of 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleosides (29, $R^1 = F$) and 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides (29, $R^1 = N_3$).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30 The present invention relates to a method and composition for treating HIV, HBV, or both HIV and HBV infections in a host comprising administering an effective amount of a described β -D- and β -L-4'-C-substituted 3'-fluoro- and 3'-

azido- 3'-dideoxynucleosides or their pharmaceutically acceptable salts and prodrugs and thereof.

More specifically, a first aspect of the present invention is directed to compounds, methods and compositions for treating a host infected with HIV, HBV, or both HIV and HBV comprising administering an effective amount of a described β -D- and β -L-nucleoside of the formulas I and II or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.



wherein:

X is hydrogen, halogen (F, Cl, Br, I), NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , or CF_3 .

Y is hydrogen, halogen (F, Cl, Br, I), NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl, optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally substituted or unsubstituted ethynyl;

R^1 is F or N_3 ;

R^2 is OH , OR^4 , OC(O)R^4 , $\text{OP(O)}_3\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{P(O)}_3\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OCH}_2\text{OP(O)}_3\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OP(O)(OQ)}_n(\text{NHR}^4)_b$, SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, SC(O)R^4 , NH_2 , NHC(O)R^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , or NHNHR^4 ;

R^3 is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C_{1-6}), one to three halogen substituted alkyl (C_{1-6}), alkenyl (C_{1-6}) or alkynyl (C_{1-6}) with the proviso that when R^1 is N_3 , R^3 is not hydroxymethyl;

Z is O, S, CH_2 or $\text{C}=\text{CH}_2$;

A is N, CH, or CF; and

R⁴ and R⁵ are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl, such as unsubstituted or substituted phenyl or benzyl

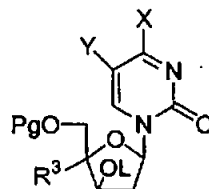
5 M is at least one member selected from the group consisting of H⁺, Na⁺, and K⁺;

v has a value of 1, 2, or 3;

x, y, and z are independent of each other and have a value of 0, 1, 2, 3, or 4; and

10 a has a value of 0 or 1, b has a value of 1 or 2, and Q is M or R⁴.

A second aspect of the present invention is directed to an intermediate of the formula:



wherein

15 X is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR⁴, NR⁴R⁵, NHOH, NHOR⁴, NHNH₂, NR⁴NH₂, NHNHR⁴, SH, SR⁴, S(O)R⁴, S(O)₂R⁴, OH, OR⁴, N₃, CN, or CF₃;

Y is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR⁴, NR⁴R⁵, NHOH, NHOR⁴, NHNH₂, NR⁴NH₂, NHNHR⁴, SH, SR⁴, S(O)R⁴, S(O)₂R⁴, OH, OR⁴,
20 N₃, CN, CF₃, hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl, optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally substituted or unsubstituted ethynyl;

R³ is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C₁₋₆), one
25 to three halogen substituted alkyl (C₁₋₆), alkenyl (C₁₋₆) or alkynyl (C₁₋₆) with the proviso that when R¹ is N₃, R³ is not hydroxymethyl;

Pg is a hydroxyl protecting group that includes, but is not limited to trityl, dimethoxytrityl, and t-butyl-silyl;

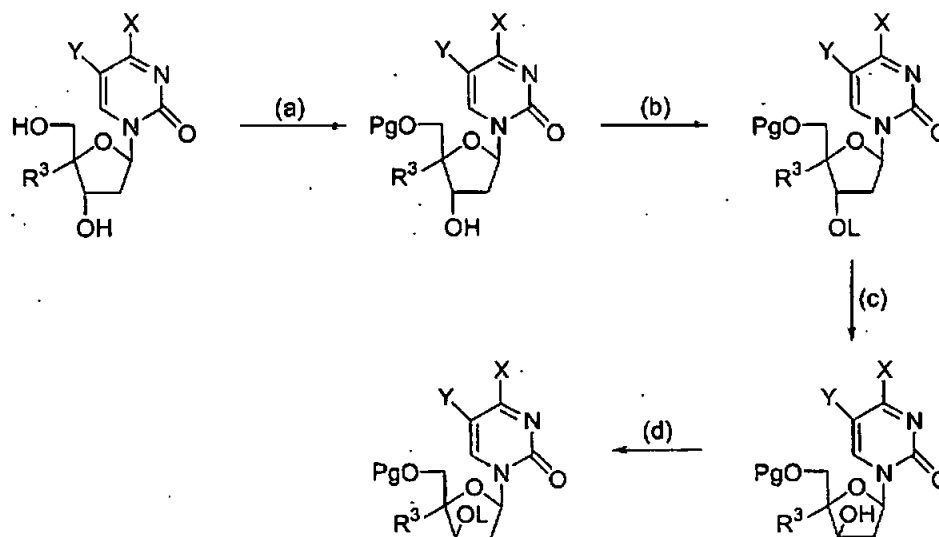
AS

L is a leaving group that includes, but is not limited to a sulfonyl, a trifluorosulfonyl, an unsubstituted sulfonate, a substituted sulfonate, an unsubstituted carbonate, and a substituted carbonate; and

5 R^4 and R^5 are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl.

A third aspect of the present invention is directed to a process for the preparation of an intermediate disclosed in the second aspect of the present invention, which comprises:

- (a): selectively protecting a 5'-OH with a protecting group, Pg, to form a 5'-OPg group;
- 10 (b): activating a 3'-OH with a leaving group, L, to form a 3'-OL group;
- (c): reacting a 3'-C with a hydroxide base in order to convert the 3'-C position from a ribo- to a xylo-configuration;
- (d): activating a 3'-OH having a xylo-configuration with a leaving group, L,
- 15 to form a 3'-OL group;

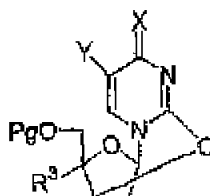


wherein

the hydroxide base includes, but is not limited to NaOH, KOH, and R^4NOH , and mixtures thereof.

20

A fourth aspect of the present invention is directed to an intermediate of formula:



wherein

X is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 ,
 NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 ,
 N_3 , CN , or CF_3 ;

Y is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 ,
 NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 ,
 N_3 , CN , CF_3 , hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or
 unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl,
 optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally
 substituted or unsubstituted ethynyl;

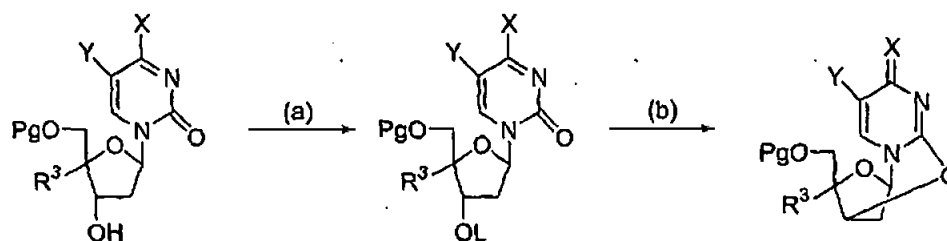
R^3 is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C_{1-6}), one
 to three halogen substituted alkyl (C_{1-6}), alkenyl (C_{1-6}) or alkynyl (C_{1-6})
 with the proviso that when R^1 is N_3 , R^3 is not hydroxymethyl;

Pg is a hydroxyl protecting group that includes, but is not limited to,
 trityl, dimethoxytrityl, and t-butyl-silyl; and

R^4 and R^5 are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl,
 acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl.

A fifth aspect of the present invention is directed to a process for the
 preparation of the intermediate disclosed in the fourth aspect of the present
 invention, which comprises:

- (a): activating a 3'-OH of a 5'-O-protected nucleoside with a leaving group,
 L; to form a 3'-OL-5'-O-protected nucleoside group; followed by
- (b): treating the 3'-OL-5'-O-protected nucleoside with DBU (1,8-
 diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) or DBN (1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene); in
 order to obtain the intermediate;



wherein L includes, but is not limited to a sulfonyl, a trifluorosulfonyl, a substituted sulfonate, an unsubstituted sulfonate, an unsubstituted carbonate, and a substituted carbonate.

5

Various embodiments of the invention are now described in detail. As used in the description herein and throughout the claims that follow, the meaning of "a," "an," and "the" includes plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Also, as used in the description herein and throughout the claims that follow, the meaning of "in" includes "in" and "on" unless the context clearly dictates otherwise.

10

The terms used in this specification generally have their ordinary meanings in the art, within the context of the invention, and in the specific context where each term is used. Certain terms that are used to describe the invention are discussed below, or elsewhere in the specification, to provide additional guidance to the practitioner in describing the compositions and methods of the invention and how to make and use them. For convenience, certain terms may be highlighted, for example using italics and/or quotation marks. The use of highlighting has no influence on the scope and meaning of a term; the scope and meaning of a term is the same, in the same context, whether or not it is highlighted. It will be appreciated that the same thing can be said in more than one way. Consequently, alternative language and synonyms may be used for any one or more of the terms discussed herein, nor is any special significance to be placed upon whether or not a term is elaborated or discussed herein. Synonyms for certain terms are provided. A recital of one or more synonyms does not exclude the use of other synonyms. The use of examples anywhere in this specification, including examples of any terms discussed herein, is illustrative only, and in no way limits the scope and meaning of the invention or of any exemplified term. Likewise, the invention is not limited to various embodiments given in this specification.

20

25

As used herein, "about" or "approximately" shall generally mean within 20 percent, preferably within 10 percent, and more preferably within 5 percent of a given value or range. Numerical quantities given herein are approximate, meaning that the term "about" or "approximately" can be inferred if not expressly stated.

5 The disclosed compounds or their pharmaceutically acceptable derivatives or salts or pharmaceutically acceptable formulations containing these compounds are useful in the prevention and treatment of HIV infections and other related conditions such as AIDS-related complex (ARC), persistent generalized lymphadenopathy (PGL), AIDS-related neurological conditions, anti-HIV antibody positive and HIV-
10 positive conditions, Kaposi's sarcoma, thrombocytopenia purpurea and opportunistic infections. In addition, these compounds or formulations can be used prophylactically to prevent or retard the progression of clinical illness in individuals who are anti-HIV antibody or HIV-antigen positive or who have been exposed to HIV.

15 The compounds and their pharmaceutically acceptable derivatives or pharmaceutically acceptable formulations containing the compound or their derivatives are also useful in the prevention and treatment of HBV infections and other related conditions such as anti-HBV antibody positive and HBV-positive conditions, chronic liver inflammation caused by HBV, cirrhosis, acute hepatitis,
20 fulminant hepatitis, chronic persistent hepatitis, and fatigue. These compounds or formulations can also be used prophylactically to prevent or retard the progression of clinical illness in individuals who are anti-HBV antibody or HBV-antigen positive or who have been exposed to HBV.

25 The compounds can be converted into a pharmaceutically acceptable ester by reaction with an appropriate esterifying agent, for example, an acid halide or anhydride. The compounds or their pharmaceutically acceptable derivative can be converted into a pharmaceutically acceptable salt thereof in a conventional manner, for example, by treatment with an appropriate base. The ester or salt of the compound can be converted into the parent compound, for example, by hydrolysis.

30 The term "independently" is used herein to indicate that the variable, which is independently applied, varies independently from application to application. Thus, in a compound such as R^aXYR^b , wherein R^a is "independently carbon or nitrogen," both R^a can be carbon, both R^b can be nitrogen, or one R^a can be carbon and the other R^b nitrogen.

As used herein, the term "enantiomerically pure" refers to a nucleoside composition that comprises at least approximately 95%, and preferably approximately 97%, 98%, 99% or 100% of a single enantiomer of that nucleoside.

As used herein, the term "substantially free of" or "substantially in the absence of" refers to a nucleoside composition that includes at least 85 or 90% by weight, preferably 95% to 98% by weight, and even more preferably 99% to 100% by weight, of the designated enantiomer of that nucleoside. In a preferred embodiment, in the methods and compounds of this invention, the compounds are substantially free of the non-designated enantiomer of that nucleoside.

Similarly, the term "isolated" refers to a nucleoside composition that includes at least 85 or 90% by weight, preferably 95% to 98% by weight, and even more preferably 99% to 100% by weight, of the nucleoside, the remainder comprising other chemical species or enantiomers.

The term "alkyl," as used herein, unless otherwise specified, refers to a saturated straight, branched, or cyclic, primary, secondary, or tertiary hydrocarbon of typically C₁ to C₁₀, and specifically includes methyl, trifluoromethyl, ethyl, propyl, isopropyl, cyclopropyl, butyl, isobutyl, *t*-butyl, pentyl, cyclopentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, cyclohexyl, cyclohexylmethyl, 3-methylpentyl, 2,2-dimethylbutyl, and 2,3-dimethylbutyl. The term includes both substituted and unsubstituted alkyl groups. Alkyl groups can be optionally substituted with one or more moieties selected from the group consisting of hydroxyl, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, cyano, sulfonic acid, sulfate, phosphonic acid, phosphate, or phosphonate, or any other viable functional group that does not inhibit the pharmacological activity of this compound, either unprotected, or protected, as necessary, as known to those skilled in the art, for example, as taught in Greeno *et al.* 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd Edition, hereby incorporated by reference.

The term "lower alkyl," as used herein, and unless otherwise specified, refers to a C₁ to C₄ saturated straight, branched, or if appropriate, a cyclic (for example, cyclopropyl) alkyl group, including both substituted and unsubstituted forms. Unless otherwise specifically stated in this application, when alkyl is a suitable moiety, lower alkyl is preferred. Similarly, when alkyl or lower alkyl is a suitable moiety, unsubstituted alkyl or lower alkyl is preferred.

30

The term "lower alkenyl," as used herein, and unless otherwise specified, refers to a C₂ to C₄ unsaturated straight or branched alkenyl group, including both substituted and unsubstituted forms. Unless otherwise specifically stated in this application, when alkenyl is a suitable moiety, lower alkenyl is preferred. Similarly, when alkenyl or lower alkenyl is a suitable moiety, unsubstituted alkenyl or lower alkenyl is preferred.

The terms "alkylamino" or "arylamino" refer to an amino group that has one or two alkyl or aryl substituents, respectively.

The term "protected," as used herein and unless otherwise defined, refers to a group that is added to an oxygen, nitrogen, or phosphorus atom to prevent its further reaction or for other purposes. A wide variety of oxygen and nitrogen protecting groups are known to those skilled in the art of organic synthesis.

The term "aryl," as used herein, and unless otherwise specified, refers to phenyl, biphenyl, or naphthyl, and preferably phenyl. The term includes both substituted and unsubstituted moieties. The aryl group can be substituted with one or more moieties selected from the group consisting of hydroxyl, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, cyano, sulfonic acid, sulfate, phosphonic acid, phosphate, or phosphonate, either unprotected, or protected as necessary, as known to those skilled in the art, for example, as taught in Greene *et al.* 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd Edition.

The terms "alkaryl" or "alkylaryl" refer to an alkyl group with an aryl substituent. The terms "aralkyl" or "arylalkyl" refer to an aryl group with an alkyl substituent.

The term "halo," as used herein, includes chloro, bromo, iodo and fluoro.

The term "acyl" refers to a carboxylic acid ester in which the non-carbonyl moiety of the ester group is selected from straight, branched, or cyclic alkyl or lower alkyl, alkoxyalkyl including methoxymethyl, aralkyl including benzyl, aryloxyalkyl such as phenoxymethyl, aryl including phenyl optionally substituted with halogen (F, Cl, Br, I), C₁ to C₄ alkyl or C₁ to C₄ alkoxy, sulfonate esters such as alkyl or aralkyl sulphonyl including methanesulfonyl, the mono, di or triphosphate ester, trityl or monomethoxytrityl, substituted benzyl, trialkylsilyl (e.g. dimethyl-*t*-butylsilyl) or diphenylmethylsilyl. Aryl groups in the esters optimally comprise a phenyl group.

51

The term "lower acyl" refers to an acyl group in which the non-carbonyl moiety is lower alkyl.

The term "host," as used herein, refers to a unicellular or multicellular organism in which the virus can replicate, including cell lines and animals, and preferably a human. Alternatively, the host can be carrying a part of the viral genome, whose replication or function can be altered by the compounds of the present invention. The term host specifically refers to infected cells, cells transfected with all or part of the viral genome and animals, in particular, primates and humans. In most animal applications of the present invention, the host is a human patient. Veterinary applications, in certain indications, however, are clearly anticipated by the present invention.

The term "pharmaceutically acceptable salt or prodrug" is used throughout the specification to describe any pharmaceutically acceptable form (such as an ester, phosphate ester, salt of an ester or a related group) of a compound which, upon administration to a patient, provides the active compound. Pharmaceutically acceptable salts include those derived from pharmaceutically acceptable inorganic or organic bases and acids. Suitable salts include those derived from alkali metals such as potassium and sodium, alkaline earth metals such as calcium and magnesium, among numerous other acids well known in the pharmaceutical art. Pharmaceutically acceptable prodrugs refer to a compound that is metabolized, for example hydrolyzed or oxidized, in the host to form the compound of the present invention. Typical examples of prodrugs include compounds that have biologically labile protecting groups on a functional moiety of the active compound. Prodrugs include compounds that can be oxidized, reduced, aminated, deaminated, hydroxylated, dehydroxylated, hydrolyzed, dehydrolyzed, alkylated, dealkylated, acylated, deacylated, phosphorylated, dephosphorylated to produce the active compound.

1. Non-limiting example of the synthesis of 4'-c-ethynyl-3'-fluoro- and 3'-azidothymidines (see Figure 2)

Treatment of thymidine with 2.2-2.5 moles of t-butyldimethylsilyl chloride in methylene chloride in the presence of imidazole followed by selective deprotection of 5'-O-silyl group in 80% acetic acid in the presence of trifluoroacetic acid gave compound 2. Oxidation of 2 with DCC in DMSO in the presence of pyridinium trifluoroacetate gave an aldehyde 3 after silica gel column

52

chromatographic purification in excellent yield. Treatment of compound 3 with aqueous formaldehyde in a mixture of 1,4-dioxane and water in the presence of 2N NaOH followed by reduction of the resulting intermediate by NaBH₄ provided diol 4. Selective protection of diol 4 with dimethoxytrityl chloride in pyridine afforded compound 5. Treatment of compound 5 with t-butyldiphenylsilyl chloride in methylene chloride in the presence of imidazole followed by detritylation in 80% acetic acid gave compound 6. Oxidation of alcohol 6 with DCC in DMSO in the presence of pyridinium trifluoroacetate provided compound 7. Reaction of compound 7 with chloromethylene Wittig reagent followed by elimination by treatment with butyllithium afforded 4'-C-ethynyl nucleoside 8. Treatment of 8 with tetrabutylammonium fluoride in THF gave 4'-C-ethynyl-thymidine 9. Treatment of 9 with DMTrCl in pyridine gave compound 10. Compound 10 was converted to 11 by treatment with MsCl followed by NaOH in EtOH. Treatment of compound 11 with DAST in methylene chloride at refluxing temperature in the presence of pyridine provided 3'-fluoronucleoside (12, X = F). 3'-Azidonucleoside (12, X = N₃) was obtained by treatment of 11 with mesyl chloride in methylene chloride in the presence of triethylamine followed NaN₃ in DMF. The final products, 4'-C-ethynyl-FLT (Ia, R¹ = F, R² = OH, R³ = ethynyl) and 4'-C-ethynyl-AZT (Ia, R¹ = N₃, R² = OH, R³ = ethynyl) are obtained by treatment of 12 with 80% acetic acid.

Alternatively, reaction of 10 with MsCl in the presence of base, such as triethylamine and the like, followed by treatment of the resulting mesylate with base, such as DBU or DBN or the like, gave intermediate 11'. Treatment of 11' with NaN₃ or tetrabutylammonium fluoride (TBAF) also provided the same intermediate 12 with X = N₃ or X=F, respectively, as disclosed in Maillard, M. et al. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1955-1958. The inventors, by way of example, do not intend to be limited to thymidine mentioned above, and hereby incorporate by reference the disclosures of US 6,949,522; US 6,403,568; and US 2005/0009737, each of which discloses examples of purines and pyrimidines that are contemplated.

2. Non-limiting example of the synthesis 4'-C-ethynyl-3'-fluoro- and 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides (see Figure 3)

Treatment of compound 13 with t-butyldimethylsilyl chloride in methylene chloride in the presence of imidazole followed by removal of chlorobenzoyl protecting group with methanolic ammonia gave compound 15. Oxidation of

- 53
- compound 15 with DCC in DMSO in the presence of pyridinium trifluoroacetate provided an aldehyde 16 after silica gel column chromatographic purification. Treatment of compound 16 with aqueous formaldehyde in a mixture of 1,4-dioxane and water in the presence of 2N NaOH followed by reduction of the resulting
- 5 intermediate with NaBH₄ afforded diol 17. Selective protection with DMTCI followed by oxidation with DCC in DMSO in the presence of pyridinium trifluoroacetate gave an aldehyde 19. Reaction of 19 with chloromethylene Wittig reagent followed by elimination in the presence of butyllithium provided 4'-C-ethynyl-xylofuranoside 20. Acetolysis of 20 with acetic anhydride in acetic acid in
- 10 the presence of concentrated sulfuric acid afforded tetraacetate 21. Coupling of 21 with silylated bases in the presence of Lewis acid, such as TMSOTf or SnCl₄, followed by deprotection with methanolic ammonia provided 4'-C-ethynyl-xylofuranosyl-nucleosides 23. Treatment of compound 23 with acetone in the presence of catalytic amount of HCl gave compound 24. Compound 24 was
- 15 subjected to Barton deoxygenation to yield 2'-deoxynucleosides 25. Deisopropylenation of 25 with 80% acetic acid followed by selective protection with BzCl in pyridine provided nucleosides 27. Treatment of compound 27 with DAST in methylene chloride at reflux temperature followed by deprotection with methanolic ammonia provided the final 4'-C-ethynyl-nucleosides (29, R¹ = F).
- 20 Treatment of 27 with methanesulfonyl chloride in methylene chloride in the presence of triethylamine followed by reaction of the resulting mesylate with NaN₃ in DMF gave 4'-C-ethynyl-nucleosides (29, R¹ = N₃).

The synthetic schemes disclosed above provide for the following contemplated compounds that include, but are not limited to: a 4'-C-substituted-3'-

25 fluoro-2',3'-dideoxynucleoside, a 4'-C-substituted-3'-azido-2',3'-dideoxynucleoside, a 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleoside, a 4'-C-ethynyl-3'-azido-2',3'-dideoxynucleoside, a 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-3'-deoxythymidine, and a 4'-C-ethynyl-3'-azido-3'-deoxythymidine.

The antivirally active nucleosides can be administered as any derivative that

30 upon administration to the host recipient is capable of providing, directly or indirectly, the parent compound, or that exhibits activity itself. Nonlimiting examples include the pharmaceutically acceptable salts (alternatively referred to as "physiologically acceptable salts") and prodrugs.

Modifications of the active compound, specifically at the N⁴ and 5'-O positions, can affect the bioavailability and rate of metabolism of the active species, thus providing control over the delivery of the active species. Further, the modifications can affect the antiviral activity of the compound, in some cases increasing the activity over the parent compound. This can easily be assessed by preparing the derivative and testing its antiviral activity according to the methods described herein, or other methods known to those skilled in the art.

The inventors of the present application also contemplate the use of an antivirally effective amount of any of the compounds disclosed herein or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

Pharmaceutically Acceptable Salts and Prodrugs

The term "pharmaceutically acceptable salt or prodrug" is used throughout the specification to describe any pharmaceutically acceptable form (such as an ester, phosphate ester, salt of an ester or a related group) of a compound which, upon administration to a patient, provides the active compound.

Pharmaceutically acceptable salts include those derived from pharmaceutically acceptable inorganic or organic bases and acids. In cases where compounds are sufficiently basic or acidic to form stable nontoxic acid or base salts, administration of the compound as a pharmaceutically acceptable salt may be appropriate. Pharmaceutically acceptable salts include those derived from pharmaceutically acceptable inorganic or organic bases and acids. Suitable salts include those derived from alkali metals such as potassium and sodium, alkaline earth metals such as calcium and magnesium, among numerous other acids well known in the pharmaceutical art. In particular, examples of pharmaceutically acceptable salts are organic acid addition salts formed with acids, which form a physiological acceptable anion, for example, but not limited to, tosylate, methanesulfonate, acetate, citrate, malonate, tartarate, succinate, benzoate, ascorbate, α -ketoglutarate, and α -glycerophosphate. Suitable inorganic salts may also be formed, including, sulfate, nitrate, bicarbonate, and carbonate salts.

Pharmaceutically acceptable salts may be obtained using standard procedures well known in the art, for example by reacting with a sufficiently basic compound such as an amine with a suitable acid affording a physiologically acceptable anion.

Alkali metal (for example, sodium, potassium or lithium) or alkaline earth metal (for example calcium) salts of carboxylic acids can also be made.

Pharmaceutically acceptable prodrugs refer to a compound that is metabolized in the host to form the compound of the present invention. Typical examples of prodrugs include compounds that have biologically labile protecting groups on a functional moiety of the active compound. Prodrugs include compounds that can be oxidized, reduced, aminated, deaminated, hydroxylated, dehydroxylated, hydrolyzed, dehydrolyzed, alkylated, dealkylated, acylated, deacylated, phosphorylated, and/or dephosphorylated to produce the active compound.

Any of the nucleosides described herein can be administered as a nucleotide prodrug to increase the activity, bioavailability, stability or otherwise alter the properties of the nucleoside. In general, alkylation, acylation or other lipophilic modification of the mono, di or triphosphate of the nucleoside will increase the stability of the nucleotide. Examples of substituent groups that can replace one or more hydrogens on the phosphate moiety are alkyl, aryl, steroids, carbohydrates, including sugars, 1,2-diacylglycerol and alcohols. Many are described in R. Jones and N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Any of these can be used in combination with the disclosed nucleosides to achieve a desired effect.

In various embodiments, prodrugs of the nucleoside derivatives, in which R^1 is F or N_3 , described herein involve substitution at the 5' carbon (R^2) with: OH, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP_vO_{3-v}M_xR^4_yR^5_z$, $P_vO_{3-v}M_xR^4_yR^5_z$, $OCH_2P_vO_{3-v}M_xR^4_yR^5_z$, $OP(O)(OQ)_a(NHR^4)_b$, SH, SR^4 , $SC(O)R^4$, NH_2 , $NHC(O)R^4$, NHR^4 , NR^4R^5 , $NHOH$, $NHOR^4$, $NHNH_2$, NR^4NH_2 , or $NHNHR^4$. R^4 and R^5 are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl, such as unsubstituted or substituted phenyl or benzyl; M is at least one member selected from the group consisting of H^+ , Na^+ , and K^+ ; v has a value of 1, 2, or 3; x, y, and z are independent of each other and have a value of 0, 1, 2, 3, or 4; and a has a value of 0 or 1, b has a value of 1 or 2, and Q is M or R^4 . The inventors appreciate that one of ordinary skill should be able to recognize that for the phosphates and phosphonates represented above, that when v is 1 the sum of x, y, and z is 2; when v is 2, the sum of x, y, and z is 3; and when v is 3, the sum of x, y, and z is 4.

The phosphates ($OP_vO_{3-v}M_xR^4_yR^5_z$) comprise mono- ($v = 1$), di- ($v = 2$), and tri-phosphates ($v = 3$) in acid, salt, or ester form, including combinations thereof. In

56

the instance where $v = 2$, the nucleoside is substituted at the 5'-C position by an R^2 having the following structure: $OP_2O_6M_xR^4_yR^5_z$, where x , y , and z have the meanings as defined above. One of ordinary skill will recognize that the pure acid form is represented by $(OP_2O_6H_3)$; the pure salt form is represented by $(OP_2O_6M_3$,
 5 $M = Na^+$, K^+ , or both Na^+ and K^+); and the pure ester form is represented by $(OP_2O_6R^4_yR^5_z$, in which, as noted above, R^4 and R^5 may be the same or different and that if different the sum of y and z does not exceed 3). Of course, it is also contemplated that phosphates may be in a mixed form. By a mixed form it is understood that the phosphate moiety may be an acid (when $M = H^+$), a salt (when
 10 $M = Na^+$ or K^+ ; or even Ca^{2+}), or an ester (in which either or both of y and z of R^4 and R^5 have non-zero values). Not to be limited by way of example, the following structures represent preferred examples of contemplated phosphates: OPO_3H_2 , $OP_2O_6H_3$, $OP_3O_9H_4$, OPO_3Na_2 , $OPO_3R^4R^5$, $OP_2O_6Na_3$, $OP_2O_6R^4_2R^5$, $OP_3O_9Na_4$, $OP_3O_9R^4_3R^5$, PO_3H_2 , $P_2O_6H_3$, $P_3O_9H_4$, PO_3Na_2 .

15 It is contemplated that R^4 , R^5 , or both R^4 and R^5 can have the following formula: $R^6C(O)OR^7$, in which R^6 is an alkyl, such as a lower alkyl, and R^7 is a lower alkylene (such as methylene, ethylene, propylene, and butylene, which may be unsubstituted or substituted (with a hydroxyalkyl, alkoxyalkyl, or haloalkyl), with the proviso that R^7 is bound to the phosphoester oxygen. Not to be limited by
 20 example, but is contemplated that the nucleoside is substituted at the 5'-C position by a moiety having the following structure: $OP(O)[OCH_2OC(O)C(CH_3)_3]_2$.

The union of the 5'-C position with the P of a moiety ($P_vO_{3v}M_xR^4_yR^5_z$) gives rise to a mono- ($v = 1$), di- ($v = 2$), or tri-phosphonates ($v = 3$), having acid, salt, or ester forms, including combinations thereof. In the instance where $v = 1$, the
 25 nucleoside is substituted at the 5'-C position by a R^2 represented by $(PO_3M_xR^4_yR^5_z)$. One of ordinary skill will recognize that the pure acid form is represented by (PO_3H_2) ; the pure salt form is represented by $(OPO_3M_2$, $M = Na^+$, K^+ , or both Na^+ and K^+); and the pure ester form is represented by $(OPO_3R^4_yR^5_z$, in which, as noted above, R^4 and R^5 may be the same or different and that if different the sum of y and
 30 z does not exceed 2). Of course, it is also contemplated that phosphonates may be in a mixed form. By a mixed form it is understood that the phosphonate moiety may be an acid (when $M = H^+$), a salt (when $M = Na^+$ or K^+ ; or even Ca^{2+}), or an ester (in which either or both of y and z of R^4 and R^5 have none zero values). Not to be limited by way of example, the following preferred examples of R^2 substituents give

59

rise to contemplated phosphonates: PO_3H_2 , $\text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$, PO_3Na_2 , $\text{P}_2\text{O}_6\text{Na}_3$, $\text{P}_3\text{O}_9\text{Na}_4$, $\text{PO}_3\text{R}^4\text{R}^5$, $\text{P}_2\text{O}_6\text{R}^4\text{R}^5$, $\text{P}_3\text{O}_9\text{R}^4\text{R}^5$.

Additionally, the inventors contemplate prodrugs of the nucleoside derivatives that involve substitution at the 5' carbon with phosphoramidates

- 5 (OP(O)(OQ)_a(NHR⁴)_b), in which a has a value of 0 or 1, b has a value of 1 or 2, and Q is M or R⁴.

The active nucleoside can also be provided as a 5'-phosphoether lipid or a 5'-ether lipid, as disclosed in the following references, which are incorporated by reference herein: Kucera, L.S., et al. 1990. *AIDS Rex Hum. Retro Viruses*. 6:491-
10 501; Piantadosi, G., et al. 1991. *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K.Y., et al. 1992, *Antim. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hosetler, K.Y., et al. 1990, *J Biol. Chem.* 265:61127.

- Nonlimiting examples of U.S. patents that disclose suitable lipophilic substituents that can be covalently incorporated into the nucleoside, preferably at the
15 5'-OH position of the nucleoside or lipophilic preparations, include U.S. Patent Nos. 5,149,794; 5,194,654; 5,223,263; 5,256,641; 5,411,947; 5,463,092; 5,543,389; 5,543,390; 5,543,391; and 5,554,728, all of which are incorporated herein by reference. Foreign patent applications that disclose lipophilic substituents that can be attached to the nucleosides of the present invention, or lipophilic preparations,
20 include WO 89/02733, WO 90/100555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, and WO 91/19721.

Pharmaceutical Compositions

- 25 Pharmaceutical compositions based upon a nucleoside compound of formula (I) and (II) or its pharmaceutically acceptable salt or prodrug can be prepared in a therapeutically effective amount for treating an HBV or HIV viral infection or abnormal cellular proliferation, optionally in combination with a pharmaceutically acceptable additive, carrier or excipient. The therapeutically effective amount may
30 vary with the infection or condition to be treated, its severity, the treatment regimen to be employed, the pharmacokinetics of the agent used, as well as the patient treated.

In one aspect according to the present invention, the compound is formulated preferably in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. In general, it is

preferable to administer the pharmaceutical composition in orally administrable form, but formulations may be administered via parenteral, intravenous, intramuscular, transdermal, buccal, subcutaneous, suppository or other route. Intravenous and intramuscular formulations are preferably administered in sterile saline. One of ordinary skill in the art may modify the formulation within the teachings of the specification to provide numerous formulations for a particular route of administration without rendering the compositions of the present invention unstable or compromising its therapeutic activity. In particular, a modification of a desired compound to render it more soluble in water or other vehicle, for example, may be easily accomplished by routine modification (salt formulation, esterification, etc.).

In certain pharmaceutical dosage forms, the prodrug form of the compound, especially including acylated (acetylated or other) and ether derivatives, phosphate esters and various salt forms of the present compounds, is preferred. One of ordinary skill in the art will recognize how to readily modify the present compound to a prodrug form to facilitate delivery of active compound to a targeted site within the host organism or patient. The artisan also will take advantage of favorable pharmacokinetic parameters of the prodrug form, where applicable, in delivering the desired compound to a targeted site within the host organism or patient to maximize the intended effect of the compound in the treatment of HBV and HIV viral infections.

The amount of compound included within therapeutically active formulations, according to the present invention, is an effective amount for treating the infection or condition, in preferred embodiments, an HBV or an HIV viral infection. In general, a therapeutically effective amount of the present compound in pharmaceutical dosage form usually ranges from about 0.1 mg/kg to about 100 mg/kg or more and all values and sub-ranges therebetween, depending upon the compound used, the condition or infection treated and the route of administration. For purposes of the present invention, a prophylactically or preventively effective amount of the compositions, according to the present invention, falls within the same concentration range as set forth above for therapeutically effective amount and is usually the same as a therapeutically effective amount.

Administration of the active compound may range from continuous (intravenous drip) to several oral administrations per day (for example, Q.I.D.,

59

B.I.D., etc.) and may include oral, topical, parenteral, intramuscular, intravenous, subcutaneous, transdermal (which may include a penetration enhancement agent), buccal and suppository administration, among other routes of administration. Enteric-coated oral tablets may also be used to enhance bioavailability and stability of the compounds from an oral route of administration. The most effective dosage form will depend upon the pharmacokinetics of the particular agent chosen, as well as the severity of disease in the patient. Oral dosage forms are particularly preferred, because of ease of administration and prospective favorable patient compliance.

10 To prepare the pharmaceutical compositions according to the present invention, a therapeutically effective amount of one or more of the compounds according to the present invention is preferably mixed with a pharmaceutically acceptable carrier according to conventional pharmaceutical compounding techniques to produce a dose. A carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., oral or parenteral. In 15 preparing pharmaceutical compositions in oral dosage form, any of the usual pharmaceutical media may be used. Thus, for liquid oral preparations such as suspensions, elixirs and solutions, suitable carriers and additives including water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, coloring agents and the like may be used. For solid oral preparations such as powders, tablets, capsules, and for 20 solid preparations such as suppositories, suitable carriers and additives including starches, sugar carriers, such as dextrose, mannitol, lactose and related carriers, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents and the like may be used. If desired, the tablets or capsules may be enteric-coated for sustained release by standard techniques. The use of these dosage forms may significantly 25 impact the bioavailability of the compounds in the patient.

For parenteral formulations, the carrier will usually comprise sterile water or aqueous sodium chloride solution, though other ingredients, including those that aid dispersion, also may be included. Where sterile water is to be used and maintained as sterile, the compositions and carriers must also be sterilized. Injectable 30 suspensions may also be prepared, in which case appropriate liquid carriers, suspending agents and the like may be employed.

Liposomal suspensions (including liposomes targeted to viral antigens) may also be prepared by conventional methods to produce pharmaceutically acceptable

60

carriers. This may be appropriate for the delivery of free nucleosides, acyl nucleosides or phosphate ester prodrug forms of the nucleoside compounds according to the present invention.

In addition, compounds according to the present invention can be
5 administered in combination or alternation with one or more antiviral, anti-HBV, anti-HIV or interferon, anti-bacterial agents, including other compounds of the present invention. Certain compounds according to the present invention may be effective for enhancing the biological activity of certain agents according to the present invention by reducing the metabolism, catabolism or inactivation of other
10 compounds and as such, are co-administered for this intended effect.

Combination or Alternation Therapy

In another embodiment, for the treatment, inhibition, prevention and/or prophylaxis of viral infection, the active compound or its derivative or salt can be
15 administered in combination or alternation with another antiviral agent. In general, in combination therapy, effective dosages of two or more agents are administered together, whereas during alternation therapy, an effective dosage of each agent is administered serially. The dosage will depend on absorption, inactivation and excretion rates of the drug as well as other factors known to those of skill in the art.
20 It is to be noted that dosage values will also vary with the severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens and schedules should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions.

25 Nonlimiting examples of antiviral agents that can be used in combination with the compounds disclosed herein include, but are not limited to, acyclovir (ACV), ganciclovir (GCV or DHPG) and its prodrugs (e.g. valyl-ganciclovir), E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU), (E)-5-vinyl-1- β -D-arabonosyluracil (VaraU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinosyluracil (BV-araU), 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinosyl)-5-iodocytosine (D-FIAC), 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -L-arabinosyl)-5-methyluracil (L-FMAU), (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine [(S)-HPMPA], (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine [(S)-HPMPDAP], (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine [(S)-HPMPC, or cidofovir], and (2S,4S)-1-

[2-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-5-iodouracil (L-5-IoddU), FTC, entecavir, interferon- α , pegelated interferon- α , lamivudine (3TC), LdT (or its prodrug), LdC (or its prodrug), and adefovir, protease inhibitors (Agenerase, Crixivan, Fortovase, Invirase, Kaletra, Lexiva, Norvir, Reyataz, Aptivus and Viracept), and non
5 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (Rescriptor, Sustiva and Viramune).

Further nonlimiting examples of antiviral agents that can be used in combination with the compounds disclosed herein include, but are not limited to, the (-)-enantiomer of 2-hydroxymethyl-5-(5-fluorocytosin-1-yl)-1,3-oxathiolane ((-)-FTC); the (-)-enantiomer of 2-hydroxymethyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oxathiolane
10 (3TC); carbovir, acyclovir, interferon, famciclovir, penciclovir, AZT, DDI, DDC, L-(-)-FMAU, and D4T.

Without intent to limit the scope of the invention, exemplary methods and their related results according to the embodiments of the present invention are given below. Note that titles or subtitles may be used in the examples for convenience of a
15 reader, which in no way should limit the scope of the invention. Moreover, certain theories are proposed and disclosed herein; however, they should in no way, regardless, whether they are right or wrong, limit the scope of the invention so long as data are processed, sampled, converted, or the like according to the invention without regard for any particular theory or scheme of action.

20

EXAMPLES

Example 1. Preparation of 4'-C-ethynylthymidine.

4'-C-Ethynylthymidine is prepared according to literature methods. (Nomura, M et al. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 2901-2908; and Ohnui, H. et al. *J. Med. Chem.*
25 2000, 43, 4516-4525).

Example 2. Preparation of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)thymidine (10, FIG. 2).

To a solution of 4'-C-ethynylthymidine (1 mmol) in pyridine (10 ml) is
30 added dimethoxytrityl chloride (1.2 mmol) at 0 °C and the resulting solution is stirred at room temperature for 3 h. EtOAc (100 mL) is added and the solution is washed with water and dried (Na₂SO₄). Solvent is evaporated to dryness under reduced pressure. The residue is co-evaporated with toluene (2 x 20 mL) and

purified by silica gel column chromatography (5% MeOH in methylene chloride) to give 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)thymidine (10).

Example 3. Preparation of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-2,3'-anhydrothymidine (11', FIG. 2).

To a solution of 10 (1 mmol) in methylene chloride (20 mL) are added triethylamine (1 mL) and methanesulfonyl chloride (1.2 mmol) and the solution is stirred at room temperature for 16 h. EtOAc (50 mL) is added and the mixture is washed with water, and dried (Na₂SO₄). Solvent is removed and the residue is dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (THF, 20 mL). To the solution is added DBU (3 mmol) and the resulting solution is refluxed for 16 h. The solution is diluted with EtOAc (50 mL) and washed with brine. Organic solution is dried (Na₂SO₄) and solvent is removed and the residue is purified by silica gel column chromatography (2% MeOH in methylene chloride) to provide compound 11'.

Example 4. Preparation of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-azido-3'-deoxythymidine (12, X=N₃, FIG. 2).

To a solution of 11' (1 mmol) in dry DMF (10 mL) is added NaN₃ (3 mmol) and the mixture is stirred at 100 °C for 16h. Solvent is evaporated to dryness under reduced pressure. The residue is co-evaporated with toluene (2 x 20 mL) and purified by silica gel column chromatography (20-50% EtOAc in hexanes) to afford 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-azido-3'-deoxythymidine (12, X=N₃).

Example 5. Preparation of 4'-C-ethynyl-3'-azido-3'-deoxythymidine (1a, X=N₃, FIG. 2).

A solution of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-azido-3'-deoxythymidine (12, X=N₃) (1mmol) in a solution of 1% trifluoroacetic acid in methylene chloride (20 mL) is stirred at room temperature for 3h and neutralized with ammonium hydroxide. Solvent is evaporated to dryness under reduced pressure and the residue is purified by silica gel column chromatography (2-5% MeOH in methylene chloride) to give 4'-C-ethynyl-AZT (1a, X=N₃).

Example 6. Preparation of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-fluoro-3'-deoxythymidine (12, X=F, FIG. 2).

To a solution of 11' (1 mmol) in dry DMF (10 mL) is added tetrabutylammonium fluoride (TBAF, 3 mmol) and the mixture is stirred at 100 °C for 16h. Solvent is evaporated to dryness under reduced pressure. The residue is co-evaporated with toluene (2 x 20 mL) and purified by silica gel column chromatography (20-50% EtOAc in hexanes) to afford 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-fluoro-3'-deoxythymidine (12, X=F).

Example 7. Preparation of 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-3'-deoxythymidine (1a, X=F, FIG. 2).

A solution of 4'-C-ethynyl-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-fluoro-3'-deoxythymidine (12, X=F) (1mmol) in a solution of 1% trifluoroacetic acid in methylene chloride (20 mL) is stirred at room temperature for 3h and neutralized with ammonium hydroxide. Solvent is evaporated to dryness under reduced pressure and the residue is purified by silica gel column chromatography (2-5% MeOH in methylene chloride) to give 4'-C-ethynyl-FLT (1a, X=F).

Anti-HIV Activity

Example 8. MTT Method Using MT-4 Cells

A test agent (100 μ L) is diluted on a 96-well microplate. MT-4 cells infected with *HIV*-1 (III_b strain; 100 TCID₅₀) and non-infected MT-4 cells are added to the microplate such that the number of cells in each well becomes 10,000. The cells are cultured at 37 °C for five days. MTT (20 μ L, 7.5 mg/ml) is added to each well, and the cells are further cultured for 2-3 hours. The cultured medium (120 μ L) is sampled, and MTT terminating solution (isopropanol containing 4% Triton X-100 and 0.04N HCl) is added to the sample. The mixture is stirred to form formazane, which is dissolved. The absorbance at 540 nm of the solution is measured. Since the absorbance is proportional to the number of viable cells, the test agent concentration at which a half value of the absorbance is measured in a test using infected MT-4 cells represents EC₅₀, whereas the test agent concentration at which a half value of the absorbance is measured in a test using non-infected MT-4 cells represents CC₅₀.

Example 9. MAGI Assay Using HeLa CD4/LTR-beta-Gal Cells

HeLa CD4/LTR-beta-Gal cells are added to 96 wells such that the number of cells in each well is 10,000. After 12-24 hours, the culture medium is removed, and a diluted test agent (100 μ L) is added. A variety of HIV strains (wild strain: WT, drug-resistant strain: MDR, M184V, NL4-3, 104pre, and C; each equivalent to 50 TCID₅₀) are added, and the cells are further cultured for 48 hours. The cells are fixed for five minutes using PBS containing 1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde. After the fixed cells are washed with PBS three times, the cells are stained with 0.4 mg/ml X-Gal for one hour, and the number of blue-stained cells of each well is counted under a transmission stereoscopic microscope. The test agent concentration at which blue-stained cells decreases to 50% and 90% in number represented EC₅₀ and EC₉₀, respectively. In a manner similar to that employed in the MTT method, cytotoxicity is measured by use of HeLa CD4/LTR-beta-Gal cells.

15

Anti-HBV Activity**Example 10. Anti-HBV AD38 Assay**

A HepG2 – AD38 cell line is established in a culture medium that comprised DMEM – F/12, 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL / 100 μ g/mL of penicillin/streptomycin, 50 μ g/mL kanamycin, 0.3 μ g/mL tetracycline, and 200 μ g/mL G418. The assay medium for the HepG2 – AD38 cell line comprises RPMI-1640, 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL / 100 μ g/mL of penicillin/streptomycin, 50 μ g/mL kanamycin, and 200 μ g/mL G418. Other materials utilized for this assay are as follows: phosphate buffered saline (PBS), biocoated 96 well plates, DNeasy 96 tissue kit (Qiagen), QIAvac 96 vacuum manifold, Micro amp optical 96 well reaction plates (Applied Biosystems), Micro amp optical caps (Applied Biosystems), Tagman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 7700 Sequence detector (Applied Biosystems), and primer and probe for HBV DNA: 1125 nM forward primer (primer 1), GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA; 1125 nM reverse primer (primer 2), GAG AGA AGT CCA CCA CGA GTC TAG A; and 250 nM probe, FAM-TGT TGA CAA GAA TCC TCA CAA TAC CAC.

30

Methodology

Cell Assay. Wells of a 96-well biocated plate are seeded with the appropriate amount of cells, such as 5×10^4 cells/well, and are incubated at 37 °C with 5% CO₂. After 2 days, the supernatant is carefully removed, and the cell layer is washed with PBS, and is subsequently renewed with assay medium with or without test
5 compounds in an appropriate amount (such as 10 µM or in a dose response with a ratio of 1:3 starting at 10 µM. Samples are tested in duplicate. Cells are allowed to grow for 5 more days, in which at day 7, an amount of supernatant, such as 180 µL, is collected and stored in an appropriate container (such as in a blue rack included in the DNeasy 96 tissue kit either at -80 °C or room temperature depending upon
10 whether or not the extraction step is to be performed immediately or at sometime afterwards.

Extraction of viral HBV DNA from cell supernatant. The supernatant samples collected at day 7 are either thawed or used as is. A Proteinase K/Buffer ATL working solution, which comprises 2 mL of Proteinase K and 18 mL of Buffer
15 ATL, is transferred on the top of the supernatant samples. The tubes are then sealed and mixed by repeated inversion. The tubes are then centrifuged, up to 3000 rpm, in order to collect any solution from the caps, which are subsequently used and referred to as the cap solution. The tubes are incubated at 55 °C for 15 minutes, and then are centrifuged up to 3000 rpm again. To each sample is added 410 µL of Buffer AL/E.
20 The tubes are sealed anew, placed in a rack, and shaken vigorously for an appropriate amount of time (such as, 15 seconds), and the tubes are then centrifuged up to 3000 rpm. At this point the DNeasy 96 plate is placed on top of QIAvac 96 vacuum manifold. The cap solution is then transferred to the DNeasy 96 plate, and vacuum is applied for an appropriate amount of time. An amount of Buffer AW1
25 (such as 500 µL) is added to each well, and then vacuum is applied again for an appropriate amount of time (such as about 1 minute). To the wells is added an amount of Buffer AW2 (such as 500 µL), and vacuum is applied again for an amount of time (such as 1 minute). The solution contents in the wells is then agitated, and then vacuum is applied again for an amount of time (such as 10
30 minutes). The DNA is eluted by adding pre-heated Buffer AE to each well and subsequently adding vacuum.

Real time PCR.

Real time PCR. It is necessary to prepare sufficient HBV primers and probe solution for 200 wells (total 1500µL) by employing the following solution that

comprises 100 μ M of primer 1, 100 μ M of primer 2, 50 μ M of probe in nuclease free water. It is also necessary to prepare a sufficient amount of a reaction mixture that comprises Universal PCR Master Mix, the HBV primers and probe solution, and nuclease free water. To each well of an optical 96 well reaction plate is added
5 an appropriate amount of the reaction mixture and HBV DNA from each sample. The wells are covered with optical caps and then they are centrifuged for the appropriate amount of time. The plate is placed in a sequence detector (such as a 7700 Sequence detector), and the reporter is selected for FAM, and the volume setting is selected for 25 μ L. The machine is started and after a certain period of
10 time (about 2 hrs.), the dCt and reduction in viral load is calculated for each test compound.

Example 11. 8 day cytotoxicity assay

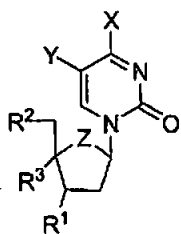
HepG2 (liver). BxPC3 (pancreatic) and CEM (Lymphocytic) cell lines are
15 established in appropriate culture media. For example, the culture media for the HepG2 cell line comprises DMEM, 10% fetal bovine serum, and 100 IU/mL / 100 μ g/mL of Penicillin/streptomycin. The assay media for BxPC3 and CEM comprises RPMI-1640, 10% fetal bovine serum, and 100 IU/mL / 100 μ g/mL of
20 penicillin/streptomycin.

Methodology. An amount of 2X drug dilutions are added to the wells of a 96-well plate. 50 μ L of 2X drug dilutions is added in a 96 well plate. In every assay, a "no drug" (medium only) control is used to determine the minimum absorbance values and a "cells + medium only" control is used for the maximum absorbance value. A
25 solvent control is also used if the drug is dissolved in DMSO. The cells are counted and resuspended in the appropriate assay medium. It is noted that the cells should be added at 2000 cells per well. New cell suspensions are added to each well and the plate is incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 8 days. After 8 days of incubation, MTS dye is added to each well and the plate is incubated for 2 hours at 37 °C with
30 5% CO₂. The plates are then read using an ELISA plate reader at a wavelength of 490 nm. The absorbance of the medium-only control wells is calculated. The 50% inhibition value (CC₅₀) is determined by comparing the absorbance in the no-drug cell control wells with the absorbance in wells containing cells and test drug.

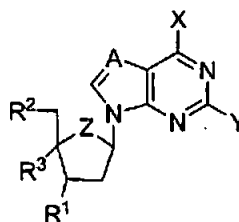
617

WE CLAIM:

1. A compound comprising a β -D- and β -L-nucleoside or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, having a structure defined by formula (I) or by formula (II):



(I)



(II)

wherein:

- 10 X is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , or CF_3 ;
- Y is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl, optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally substituted or unsubstituted ethynyl;
- 15 R^1 is F or N_3 ;
- 20 R^2 is OH , OR^4 , OC(O)R^4 , $\text{OP}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{P}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OCH}_2\text{P}_v\text{O}_{3v}\text{M}_x\text{R}^4_y\text{R}^5_z$, $\text{OP(O)(OQ)}_a(\text{NHR}^4)_b$, SH , SR^4 , $\text{S(O)}_b\text{R}^4$, SC(O)R^4 , NH_2 , NHC(O)R^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 ;
- 25 R^3 is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C_{1-6}), one to three halogen substituted alkyl (C_{1-6}), alkenyl (C_{1-6}) or alkynyl (C_{1-6}) with the proviso that when R^1 is N_3 , R^3 is not hydroxymethyl;
- Z is O, S, CH_2 or $\text{C}=\text{CH}_2$;
- A is N, CH, or CF ; and

R^4 and R^5 are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl;

M is at least one member selected from the group consisting of H^+ , Na^+ , and K^+ ;

5 v has a value of 1, 2, or 3;

x, y, and z are independent of each other and have a value of 0, 1, 2, 3, or 4; and

a has a value of 0 or 1, b has a value of 1 or 2, and Q is M or R^4 .

10 2. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-substituted-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleoside.

3. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-substituted-3'-azido-2',3'-dideoxynucleoside.

15

4. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-2',3'-dideoxynucleoside.

20

5. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-ethynyl-3'-azido-2',3'-dideoxynucleoside.

6. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-ethynyl-3'-fluoro-3'-deoxythymidine.

25

7. The compound of claim 1, wherein the nucleoside is a 4'-C-ethynyl-3'-azido-3'-deoxythymidine.

30

8. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of any of claims 1-7 and carrier or diluent.

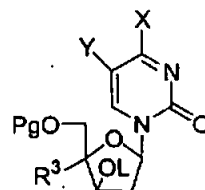
9. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of any of claims 1-7 and at least one of other antiviral agents.

10. A method for the treatment or prophylaxis of a host infected with human immunodeficiency virus comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of any of claims 1-7, or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, alone or in combination with another agent.

11. A method for the treatment or prophylaxis of a host infected with hepatitis B virus comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of any of claims 1-7, or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, alone or in combination with another agent.

12. Use of an antivirally effective amount of a compound of any of claims 1-7 or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

13. An intermediate of the formula:



wherein

X is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , or CF_3 ;

Y is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl, optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally substituted or unsubstituted ethynyl;

R^3 is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C_{1-6}), one to three halogen substituted alkyl (C_{1-6}), alkenyl (C_{1-6}) or alkynyl (C_{1-6}) with the proviso that when R^1 is N_3 , R^3 is not hydroxymethyl;

Pg is a hydroxyl protecting group;

L is leaving group; and

R⁴ and R⁵ are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl.

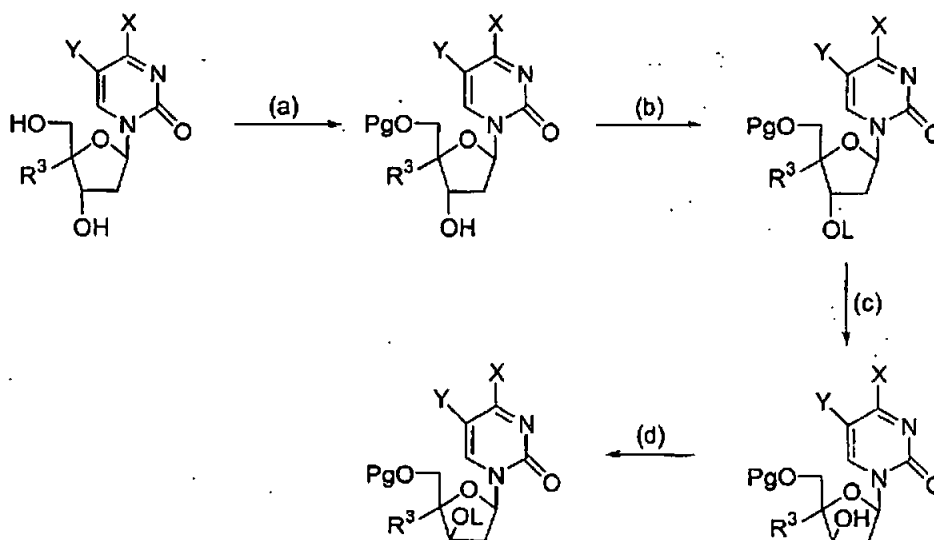
- 5 14. A process for the preparation of an intermediate of claim 13, which comprises:

(a): selectively protecting a 5'-OH with a protecting group, Pg, to form a 5'-OPg group;

(b): activating a 3'-OH with leaving group, L, to form a 3'-OL group;

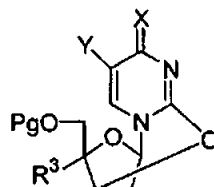
10 (c): reacting a 3'-C with a hydroxide base in order to convert the 3'-C position from a ribo- to a xylo-configuration;

(d): activating a 3'-OH having a xylo-configuration with a leaving group, L, to form a 3'-OL group.



15

15. An intermediate of formula:



wherein

X is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , or CF_3 ;

Y is hydrogen, F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , NHOH , NHOR^4 , NHNH_2 , NR^4NH_2 , NHNHR^4 , SH , SR^4 , S(O)R^4 , $\text{S(O)}_2\text{R}^4$, OH , OR^4 , N_3 , CN , CF_3 , hydroxymethyl, methyl, optionally substituted or unsubstituted ethyl, optionally substituted or unsubstituted vinyl, optionally substituted or unsubstituted 2-bromovinyl, optionally substituted or unsubstituted ethynyl;

R^3 is F, cyano, azido, ethynyl, chlorovinyl, fluorovinyl, alkyl (C_{1-6}), one to three halogen substituted alkyl (C_{1-6}), alkenyl (C_{1-6}) or alkynyl (C_{1-6}) with the proviso that when R^1 is N_3 , R^3 is not hydroxymethyl;

Pg is a hydroxyl protecting group; and

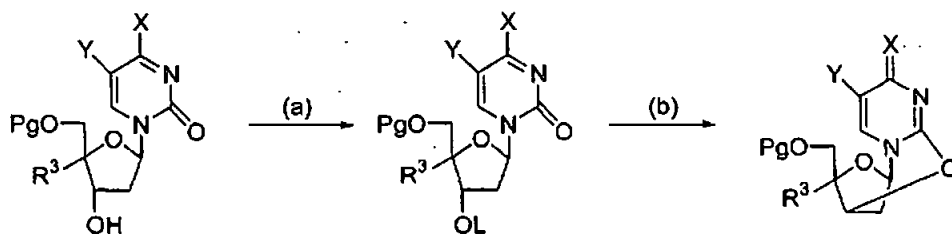
R^4 and R^5 are the same or different and are lower alkyl, lower alkenyl, acyl of carbon 1-17, aryl, or aralkyl.

16. A process for the preparation of an intermediate of claim 15, which comprises:

(a): activating a 3'-OH of a 5'-O-protected nucleoside with a leaving group,

L; to form a 3'-OL-5'-O-protected nucleoside group; followed by

(b): treating the 3'-OL-5'-O-protected nucleoside with DBU or DBN; in order to obtain the intermediate;



wherein L is selected from the group consisting of a sulfonyl, a trifluorosulfonyl, a substituted sulfonate, and an unsubstituted sulfonate.

FIGURE 2

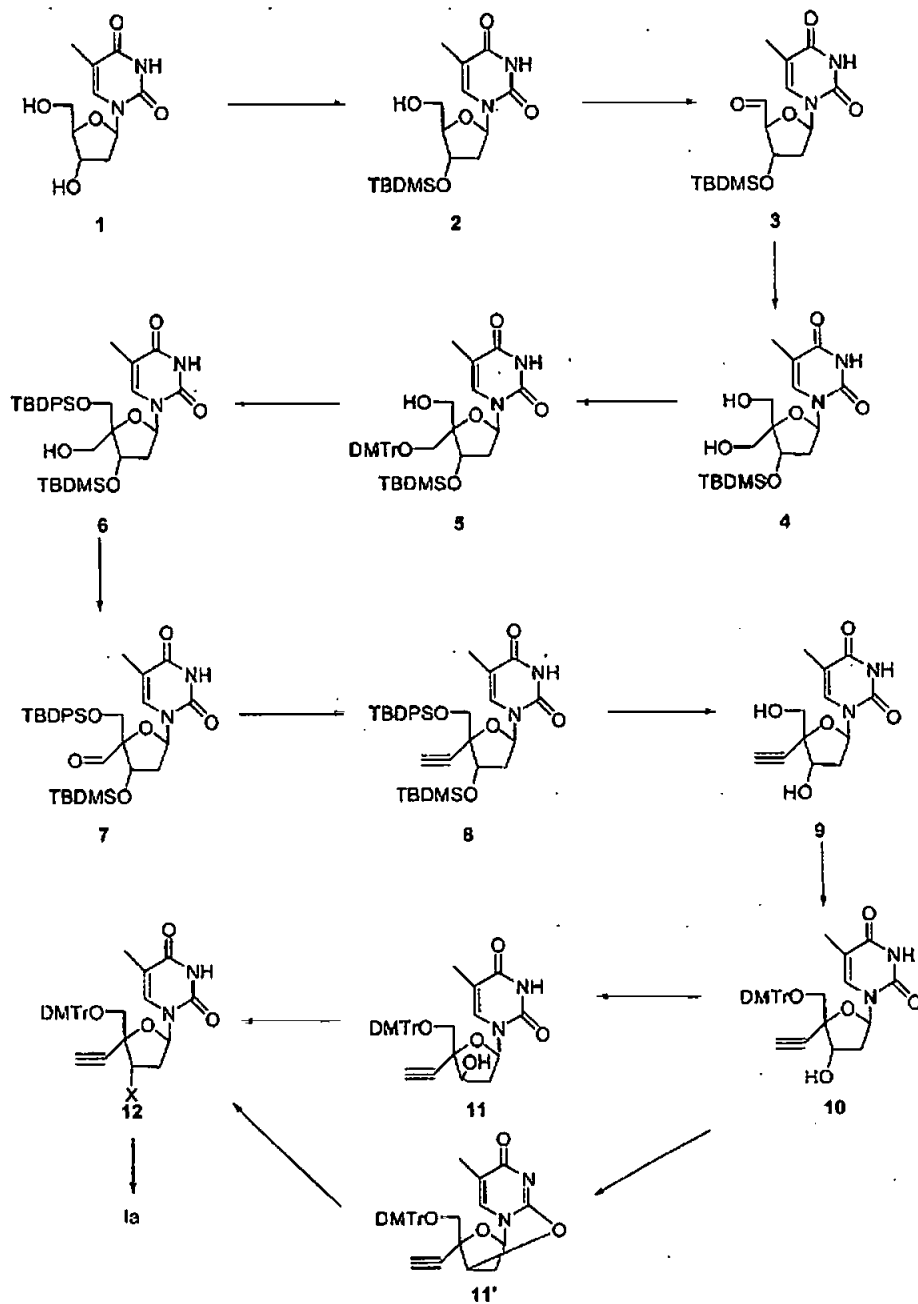
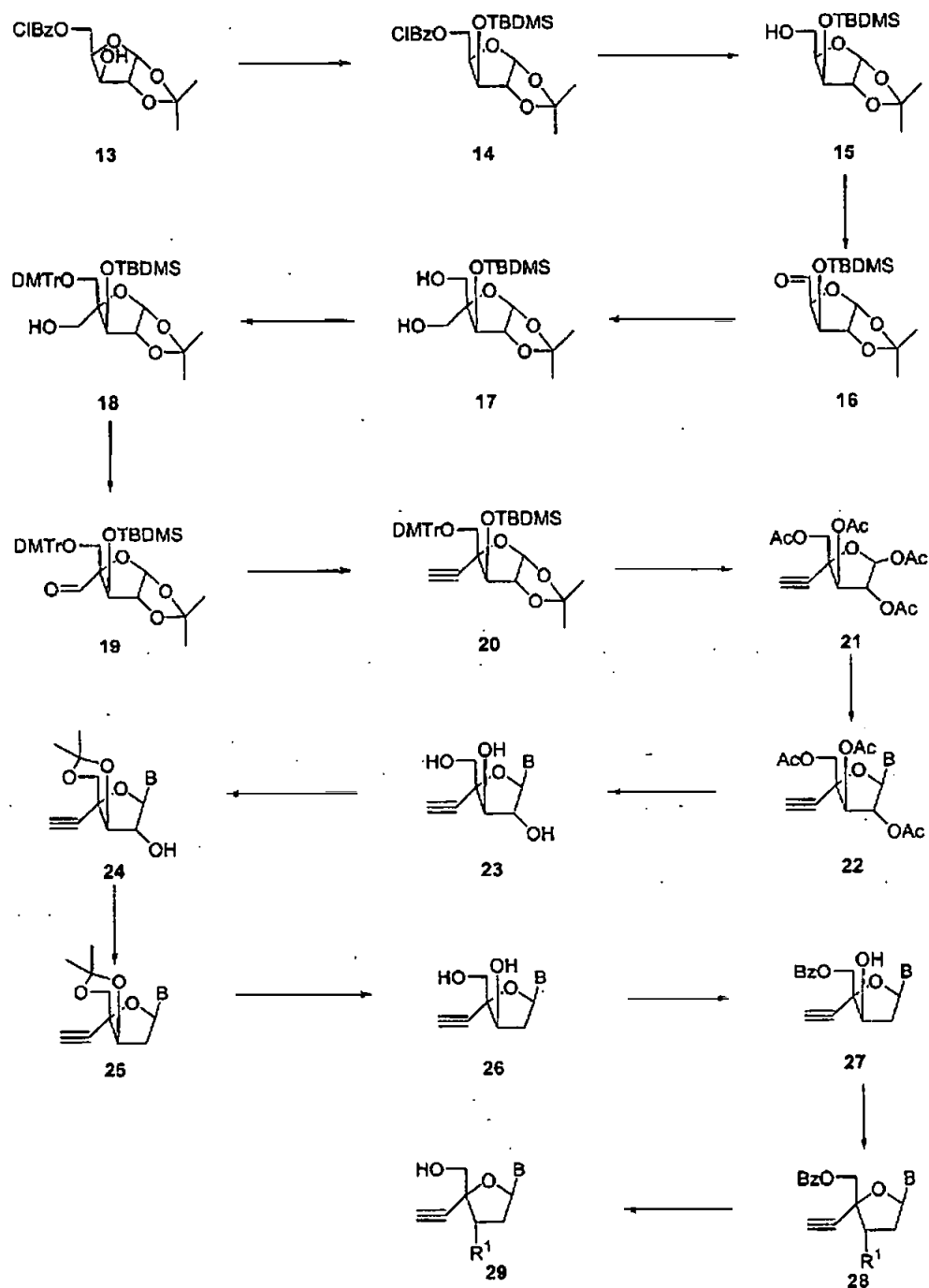


FIGURE 3



75

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-039672- -00000-0000

Fecha: 2008-04-18 17:01:40 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eva: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 31,582
FECHA : ABRIL 18 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	662754387	629414	18/04/2008	16,284,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que 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 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 un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha



No. 08-039672-00000-0000

Fecha: 2008-04-18 17:01:40 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Commutador: 3 82 08 40
Fax: 350 62 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO BONILLA JERONIMO

REFERENCIA	Radicación No.	8 39672
	Solicitud internacional	PCT/US2006/037470
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

8303

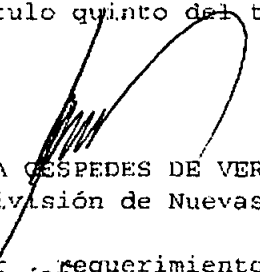
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. 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 485.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

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 Única 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 27 JUN. 2008
adpall