



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 423**

51 Int. Cl.:  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 31/22** (2006.01)  
**C07D 519/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07709426 .6**  
96 Fecha de presentación : **22.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1976853**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **Nuevos compuestos y su uso.**

30 Prioridad: **23.01.2006 SE 0600134**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.10.2011**

73 Titular/es: **VIRONOVA AB.**  
**Gavlegatan 22**  
**113 30 Stockholm, SE**

72 Inventor/es: **Homman, Mohammed;**  
**Engqvist, Robert;**  
**Söderberg-Nauclér, Cecilia y**  
**Bergman, Jan**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 423 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos y su uso

## CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de indoloquinolina y a métodos para prepararlos, así como a su uso farmacéutico. En particular, la invención se refiere a nuevos derivados de indoloquinolina y a su uso en el tratamiento de infecciones víricas.

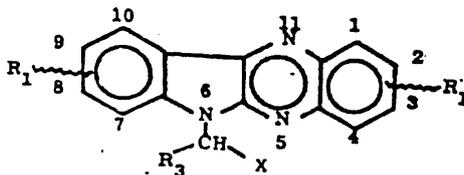
## FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

10 Como es bien sabido, los virus son la causa etiológica de muchas enfermedades, a veces muy graves, tanto de seres humanos como de los animales. Por ejemplo, los virus del herpes tales como el del herpes simplex 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus varicella zoster (VZV) y virus humano del herpes 6 (HHV 6) están asociados con muchas enfermedades víricas comunes.

La infección por CMV humano (HCMV) es una dolencia de por vida cuyo resultado puede ser la morbilidad y la mortalidad. Las patologías asociadas con el HCMV incluyen microcefalia, hepatoesplenomegalia, ictericia, encefalitis, infecciones de los recién nacidos o de los fetos en el útero, e infecciones de hospedadores inmunocomprometidos.

15 Por varias razones, un creciente número de personas están en riesgo de infección por HCMV, y en la actualidad se estima que el 80% de los adultos en los Estados Unidos están infectados con el HCMV. Un grupo particularmente susceptible es el de aquellos que tienen el sistema inmunitario debilitado, tal como los pacientes de SIDA, en los que la infección por HCMV puede provocar retinitis, gastritis y neumonitis. También, las neumonías o hepatitis inducidas por el HCMV son complicaciones frecuentes y graves de los trasplantes de médula ósea.

20 La patente europea EP 0 238 459 se refiere a indoloquinolinas sustituidas que tienen la fórmula general

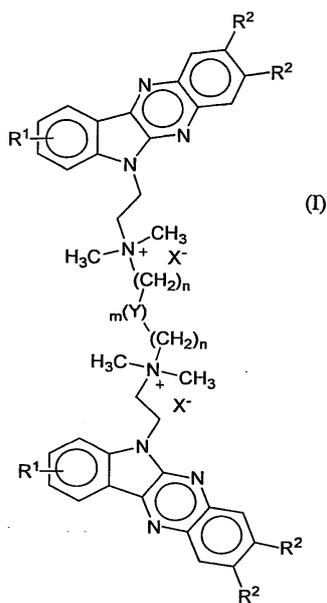


25 en la que R<sub>1</sub> representa hidrógeno o uno o varios, preferentemente de 1 a 4, sustituyentes similares o diferentes en las posiciones 1 - 4 y/o 7 - 10, elegidos entre halógeno, preferentemente Br, un grupo alquilo o alcoxi inferior que tiene no más de 4 átomos de carbono, un grupo trifluorometilo, un grupo triclorometilo; X es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>2</sub>, en donde R<sub>2</sub> representa un resto básico que contiene nitrógeno tal como NH<sub>2</sub>, NHR<sub>4</sub> o NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> independientemente son alquilo o cicloalquilo inferior y n es un número entero de 1 a 4, y R<sub>3</sub> representa hidrógeno, un grupo alquilo o cicloalquilo inferior que tiene no más de 4 átomos de carbono, y los productos de adición aceptables fisiológicamente de los compuestos con ácidos y aductos de halógeno, preferentemente aductos con yodo, monocloruro de yodo o monobromuro de yodo.

30 Sin embargo, es evidente que existe aún una necesidad urgente de nuevos medicamentos que tengan eficacia antiviral, en particular contra virus del herpes tales como el HCMV, y un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos que satisfagan esta necesidad.

## SUMARIO DE LA INVENCION.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



(I)

en la que

R<sup>1</sup> se elige entre H, F, Cl, Br, CF<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> y OH;

R<sup>2</sup> se elige entre H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>;

5 n es de 1 a 12;

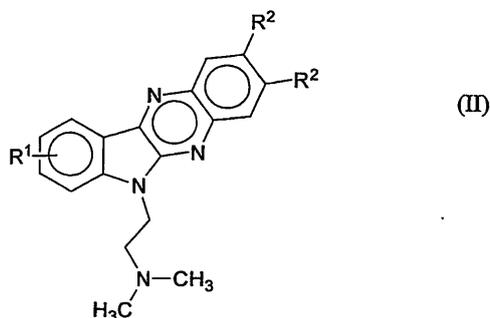
m es 0 o 1; y

Y se elige entre CH<sub>2</sub>, NR<sup>3</sup>, (NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sup>+</sup> X<sup>-</sup>, O y S;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se eligen independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; y

X<sup>-</sup> se elige entre aniones farmacéuticamente aceptables.

10 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para preparar un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (II)



(II)

con un compuesto de fórmula (III)



15 en la que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, Y, m y n son como se han definido antes en el presente texto en relación con la fórmula (I); y

L es un grupo lábil;

en un disolvente o una mezcla de disolventes.

De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es una composición antiviral adecuada para el tratamiento de una infección vírica.

En las reivindicaciones se definen otros aspectos de la invención así como realizaciones de las mismas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

En una realización de la presente invención, R<sup>1</sup> en la fórmula (I) se elige entre H, F, Cl, Br, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> y OH.

- 10 Además, en una realización de la invención, R<sup>2</sup> en la fórmula (I) se elige entre H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>, p. ej. H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>, tal como H y CH<sub>3</sub>.

El ion contrario X<sup>-</sup> en la fórmula (I) puede ser cualquier anión adecuado farmacéuticamente aceptable, tal como Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, metanosulfonato, toluenosulfonato, acetato, citrato y maleato.

- 15 El índice n en la fórmula (I) puede elegirse entre cualquier valor comprendido entre 1 y 12, tal como 2 a 10, o 4 a 10, p. ej. 4 a 8; o 1 a 6, p. ej. 1 a 3.

El compuesto de fórmula (II), usado en la preparación del compuesto de la invención, puede prepararse como se enseña de una forma general en el documento EP 0 238 459 así como en la patente de EE.UU. n° 4.990.510, siendo ambas patentes incorporadas al presente texto como referencia.

- 20 El compuesto de fórmula (III), o sea L(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (Y)<sub>m</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> L, puede ser sintetizado por métodos bien conocidos por los profesionales expertos en la técnica, o puede ser adquirido de suministradores de productos químicos.

El grupo lábil L de fórmula (III) puede elegirse adecuadamente entre, p. ej., Cl, Br, metanosulfonilo y toluenosulfonilo, aunque un experto en la técnica caerá en la cuenta de que también pueden considerarse otros grupos lábiles.

- 25 El sistema disolvente usado debe ser uno en el que las sustancias reaccionantes sean solubles en las condiciones que se hayan elegido para la reacción, y adecuadamente debe ser tal que favorezca la reacción que conduce al producto deseado. Como ejemplo, pueden elegirse uno o varios disolventes apróticos o próticos, tales como acetonitrilo, THF, metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo y acetato de metilo. Cae dentro de los conocimientos de los profesionales expertos en la técnica elegir tal sistema disolvente así como las condiciones de reacción adecuadas.

- 30 Los compuestos de la invención son útiles como agentes antivirales y por tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica antiviral que comprende un compuesto de fórmula (I) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento de un virus elegido entre virus del herpes, tal como el herpes simplex 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus varicella zoster (VZV) y virus del herpes humano tipo 6 (HHV 6).

En una realización de la invención, el virus es un citomegalovirus humano.

- 35 Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser, por ejemplo, vehículos, coadyuvantes, portadores o diluyentes, tal como los que conocen los profesionales expertos en la técnica y como se describen, p. ej., en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (2005). Además, se contempla que la composición farmacéutica de la invención, además de un compuesto de fórmula (I), puede contener también otras sustancias terapéuticamente activas, p. ej. otros agentes antivirales.

- 40 La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada parenteralmente u oralmente, y puede ser usada en un tratamiento antiviral local o sistémico de un animal vertebrado en necesidad de tal tratamiento, p. ej. un ave o un mamífero, tal como una persona o un animal tal como un animal doméstico o un animal de granja. Se contempla que una composición farmacéutica de la invención pueda ser administrada junto con otros fármacos compatibles, tales como otro fármaco antiviral en una terapia con fármacos múltiples.

A continuación, en el presente texto, la invención se ilustra con más detalle por medio de ejemplos que, sin embargo, no han de considerarse limitantes de la invención, y cuyo alcance está definido por las reivindicaciones. Se ha de observar que la numeración de cada uno de los dos sistemas de anillos es la misma que para la fórmula general de la indoloquinolina sustituida de la patente europea EP 0 238 459, como se muestra a continuación.

## 5 EJEMPLOS

### Preparación de compuestos de la invención.

10 Los espectros de NMR fueron obtenidos en soluciones en DMSO-d<sub>6</sub> a temperatura ambiente y usando la señal de DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: δ = 2,50 ppm; <sup>13</sup>C: δ = 39,5) como patrón interno, en un espectrómetro Bruker DPX 300 (300 MHz). Los valores de δ se dan en ppm. Los disolventes eran de calidad para análisis y se usaron tal como se recibieron del suministrador.

### EJEMPLO I.

#### Síntesis de dímeros de alquileo.

##### Procedimiento general (escala 10 mmol).

15 Se calentaron B-220 (fórmula II, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, o derivados de los mismos), dihaloalcano y acetonitrilo (a reflujo o a 70 °C) durante 15 h. El sólido que se forma se aisló mediante filtración, se lavó con acetonitrilo y se secó.

**1a)** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, n = 3, m = 0, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

Rendimiento: 70%; <sup>1</sup>H-NMR δ: 8,34 (d, 1H); 7,94 (m, 2H); 7,77 (m, 2H); 7,43 (t, 1H); 4,93 (br. s, 2H); 3,86 (br. s, 2H); 3,54 (br. s, 2H); 3,27 (s, 6H); 2,39 (s, 6H); 1,77 (br. s, 2H); 1,28 (br. s, 2H).

**1b)** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, n = 5, m = 0, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

20 Rendimiento: 49 %; <sup>1</sup>H-NMR δ: 8,35 (d, 1H); 8,00 (s, 1H), 7,92 (d, 1H); 7,80 (m, 2H); 7,45 (t, 1H); 4,91 (t, 2H); 3,85 (t, 2H); 3,49 (m, 2H); 3,24 (s, 6H); 2,48 (s, 3H); 2,45 (s, 3H); 1,69 (m, 2H); 1,17 (s, 6H).

**1c)** R<sup>1</sup> = 9-Br, R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, n = 3, m = 0, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

Rendimiento: 73 %; <sup>1</sup>H-NMR δ: 8,39 (s, 1H); 8,08-7,81 (m, 3H); 7,73 (s, 1H); 5,16 (br. s, 2H); 3,69 (br. s, 2H); 3,43 (br. s, 2H); 3,25 (s, 6H); 2,39 (s, 3H); 2,37 (s, 3H); 1,88 (br. s, 2H); 1,32 (br. s, 2H).

25 **1d)** R<sup>1</sup> = 9-Cl, R<sup>2</sup> = H, n = 3, m = 0, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

<sup>13</sup>C-NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ: 21,6 (t); 25,2 (t); 35,3 (t); 50,8 (q); 59,0 (t); 63,3 (t); 112,6 (d); 120,4 (s); 121,6 (d); 126,1 (s); 126,8 (d); 127,5 (d); 129,3 (d); 129,8 (d); 131,1 (d); 138,6 (s); 139,0 (s); 139,8 (s); 142,0 (s); 144,9 (s).

**1e)** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, n = 1, m = 1, Y = CH<sub>2</sub>, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

30 <sup>13</sup>C-NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ: 17,0 (t); 35,0 (t); 50,9 (q); 59,9 (t); 60,5 (t); 110,8 (d); 119,0 (s); 121,7 (d); 122,4 (d); 126,5 (d); 127,5 (d); 129,2 (d) \* , 131,5 (d); 138,9 (s); 139,5 (s); 139,7 (s) 143,5 (s); 144,7 (S).

\* 1 señal para dos carbonos

**1f)** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, n = 3, m = 0, X<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>

<sup>13</sup>C-NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ: 21,7 (t); 25,4 (t); 35,0 (t); 50,8 (q); 59,2(t); 63,2 (t); 110,7 (d); 119,1 (s); 121,8 (d); 122,5 (d); 126,6 (d); 127,4 (d); 129,2 (d); 129,3 (d); 131,6 (d); 139,0 (s); 139,6 (s); 139,8 (s); 143,6 (s); 144,8 (s).

35

## EJEMPLO 2

**Síntesis de dímeros de éter.****Procedimiento general** (escala 10 mmol).

5 Se calentaron a reflujo B-220 (o sus derivados), dihaloalcano y acetonitrilo durante 20 h. El sólido así formado se aisló mediante filtración, se lavó con acetonitrilo y se secó.

**2a)**  $R^1 = H$ ,  $R^2 = CH_3$ ,  $n = 2$ ,  $Y = O$ ,  $m = 1$ ,  $X = Br^-$ .

Rendimiento: 58 %;  $^1H$ -NMR  $\delta$ : 8,22 (d, 1H); 7,84 (s, 1H); 7,72 (m, 2H) 7,59 (s, 1H); 7,47 (d, 1H); 7,38 (t, 1H); 7,08 (d, 1H); 4,85 (t, 2H); 4,09 (br. s, 2H); 3,93 (m, 4H); 3,29 (s, 6H); 2,35 (s, 3H); 2,26 (s, 3H); 2,24 (s, 3H),

**2b)**  $R^1 = 9-Br$ ,  $R^2 = CH_3$ ,  $n = 2$ ,  $Y = O$ ,  $m = 1$ ,  $X = Br^-$ .

10 Rendimiento: 91 %;  $^1H$ -NMR  $\delta$ : 8,02 (d, 1H); 7,77 - 7,66 (m, 3H); 7,49 (s, 1H); 7,45 (d, 2H); 7,07 (d, 2H); 4,78 (t, 2H); 4,11 (br. s, 2H); 3,95 - 3,90 (m, 4H); 3,27 (s, 6H); 2,31 (s, 3H); 2,26 (s, 3H); 2,18 (s, 3H).

**Ensayo biológico.**

15 Se llevaron a cabo ensayos de la actividad antiviral contra el citomegalovirus humano como se describe más adelante en el presente texto, sobre un compuesto de acuerdo con la invención, como es el compuesto 1a del EJEMPLO 1. El compuesto de referencia denominado B-220 es 2,3-dimetil-6-(N,N-dimetilaminoetil)-6H-indolo(2,3-b)quinoxalina, descrito en la patente europea EP 0 238 459.

**Ensayo de los efectos inhibidores sobre la infección viral.**

20 Para determinar si el direccionamiento de proteínas virales estructurales sería tan eficaz como el direccionamiento de la transcripción viral, se estableció un ensayo en placa modificado, en el que uno de los nuevos agentes antivirales fue comparado con agentes antivirales ya conocidos que inhiben o la transcripción del HCMV [GCV (Cymevene, Roche) y PFA (Foscavir, AstraZeneca)] o la infección [IVIg (IVIg CP, Biotest Pharma), un anticuerpo].

25 En un experimento 0 dpi (días después de la infección: days post infection) se añadieron al mismo tiempo los agentes antivirales y TB40/E, indicando así hasta qué punto los agentes inhiben la infección. Los resultados de este experimento fueron obtenidos comparando la cantidad de células infectadas de los pocillos tratados con la de los testigos positivos, calculando entonces la inhibición de la infección conseguida por los agentes en cuestión. El experimento se repitió con la cepa de HCMV AD-169 y con un material aislado clínico, respectivamente, con esencialmente los mismos resultados.

El efecto inhibitor de las sustancias de ensayo se muestra en la Tabla 1, como el % de inhibición de la infección. Estos datos son los resultados de ensayos en placa usando las cepas AD 169 y TB 40 de fibroblastos de pulmón humano infectados por HCMV.

<b>Tabla 1. Efecto inhibitor de las sustancias ensayadas en forma de % de inhibición de la infección</b>	
<b>Sustancia</b>	<b>Efecto inhibitor (%)</b>
1a	100
IVIC (referencia)	100
B-220 (referencia)	20
Leflunomida (referencia)	25 – 50
Foscavir (referencia)	20 – 50
Ganciclovir (referencia)	20 - 30

30 Los resultados del ensayo indican que los compuestos de la invención tienen un excelente efecto inhibitor sobre la infección viral.

**Ensayo de inhibición del montaje y la salida del HCMV.**

35 Células de fibroblasto de pulmón humano (células HL: human lung) infectadas fueron tratadas con el agente antiviral B-220 y con otras sustancias de referencia, como se muestra en la Tabla 2, y con compuesto de la invención 1a, con el fin de evaluar el efecto de los compuestos de la invención sobre la infección, el montaje y la salida del HCMV.

Los agentes antivirales fueron añadidos a los 3 o 5 días después de la infección (dpi) en estos experimentos y se dejaron en cultivo hasta 7 dpi. A continuación, el sobrenadante y las células trituradas fueron transferidos a nuevos cultivos

de células durante la noche y subsiguientemente fueron teñidos para la expresión de IE. Los resultados indican hasta qué punto las sustancias impiden el montaje y la salida virales. Más específicamente, a 3 dpi la mayor parte de las cápsidas virales están siendo ensambladas en el núcleo, mientras que a 5 dpi principalmente están recibiendo su tegumentación en el citoplasma y algunas han iniciado su envoltura secundaria.

- 5 En la Tabla 2 se muestra el efecto inhibitor de las sustancias antivirales usando el sistema de ensayo en placa modificado. Varias sustancias mostraron un 100% de inhibición de la expresión de IE, medida por la tinción de IE, y no se observó formación de la cápsida en el núcleo de la mayoría de las células tratadas, como se observa mediante el examen con microscopía electrónica. El compuesto de la invención señalado 1a manifestó unos resultados extraordinariamente buenos que concuerdan con los resultados obtenidos por el Ganciclovir.

<b>Tabla 2. Efecto inhibitor de sustancias antivirales</b>		
<b>Sustancia</b>	<b>Inhibición 3 dpi (%)</b>	<b>Inhibición 5 dpi (%)</b>
1a	95 – 100	85 – 95
B-220 (referencia)	65 – 85	65 – 80
Leflunomida (referencia)	65 – 80	80 – 90
Foscavir (referencia)	85 – 100	65 – 85
Ganciclovir (referencia)	100	80 – 95

10

#### **Mecanismo de acción.**

15 Sin desear vincularse a ninguna teoría del mecanismo de acción de los compuestos de la invención, se señala que el compuesto de la presente invención ensayado 1a muestra una inhibición muy clara de la expresión de IE. Además, los datos de microscopía electrónica indican el deterioro del ensamblado del virus. Realmente, la técnica de análisis de la imagen usada para identificar y cuantificar partículas intermedias estables de HCMV indica el deterioro de la unión de la proteína del tegumento a la cápsida viral. Juntos estos datos muestran un alto potencial para el uso de los compuestos de la presente invención en terapia antiviral. También, mediante el uso de los compuestos de la presente invención en combinación con al menos otro agente antiviralmente activo, tal como en una terapia multifármaco, se espera un efecto sinérgico y el riesgo de adquirir resistencia al fármaco puede verse reducido o evitado.

20

#### **Toxicidad.**

25 Los compuestos de la presente invención no mostraron toxicidad alguna al ser ensayados mediante tinción con yoduro de propidio de cultivos de células de fibroblastos de pulmón humano infectadas y no infectadas. Una concentración de compuesto 1 a 10 veces la usada en los experimentos indicó ausencia de toxicidad durante el marco de tiempo de 0 a 7 dpi. Las concentraciones de compuestos usadas en los experimentos virales estaban en el nivel de  $\mu\text{M}$ . Se ha mostrado toxicidad celular para B-220 para concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$ .

25

#### **Materiales y Métodos.**

##### **Cultivo de células.**

30 Los fibroblastos de pulmón humano, células HL (MRC-5), usadas en estos experimentos fueron incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una solución de MEM con Earle's y L-glutamina (de GIBCO) en la que se añadió 10% de suero de ternera fetal (Foetal Calf Serum: FCS) y 1% de penicilina y estreptomina (PeSt).

30

Cuando comenzó el experimento las células HL se mantuvieron en un frasco de cultivo de células Falcon de 175 cm<sup>2</sup>. Se usó tripsina y EDTA para desprender las células del frasco de cultivo cuando se transfirieron a multipocillos de 48 pocillos (Becton Dickinson) para infección e incubación con los agentes antivirales.

35

Las células fueron incubadas hasta que se alcanzó un 50% de confluencia bajo las mismas condiciones que antes, y se usaron hasta el 26° paso.

##### **Infección de las células con HCMV.**

40 Las células HL fueron infectadas con HCMV, cepa viral TB 40/E [un material aislado clínico adaptado endotelial (UR 1814) proporcionado gentilmente por el Prof. G. Jahn] y cepa viral AD-169, respectivamente, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,02 y se incubaron hasta 3 o 5 días posteriores a la infección (dpi) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en los mismos medios que antes. Algunas células (para el experimento 0 dpi) fueron expuestas simultáneamente a los agentes antivirales (véase más adelante). Los testigos o controles negativos se dejaron sin infectar.

40

**Exposición de las células a inhibidores y agentes antivirales.**

5 El medio existente (en los experimentos 3 y 5 dpi) se cambió y se añadió medio nuevo, con inhibidores y agentes antivirales a diferentes concentraciones. Sin embargo esto se hizo al mismo tiempo que la infección en el experimento 0 dpi y se dejó incubar hasta 1 dpi. El medio que contiene IVIg fue incubado durante una hora con el virus en hielo antes de ser añadido a las células.

**Ensayo en placa modificado.**

10 En los experimentos 3 y 5 dpi el sobrenadante de las células MRC-5 fue transferido a células no infectadas para evaluar la cantidad de virus excretado. Se administró medio nuevo a las células restantes y se trituraron con bolitas de vidrio agitando los multipocillos en un aparato IKA- Vibrax- VXR a 300 sacudidas por minuto durante 10 minutos. A continuación los residuos de las células se transfirieron a células no infectadas para poder evaluar la cantidad de partículas virales intracelulares infecciosas.

Después de dejar que las partículas virales infecten las nuevas células durante aproximadamente una hora, el medio fue cambiado, eliminándose así por lavado los residuos celulares. En los experimentos 0 dpi las células fueron fijadas inmediatamente 1 dpi (de acuerdo con el procedimiento expuesto más adelante).

15 Los testigos positivos (células infectadas no tratadas) y negativos (células no infectadas no tratadas), fueron tratados, respectivamente, como antes.

**Tinción inmunofluorescente de las células.**

20 Las nuevas células HL (en los experimentos 3 y 5 dpi) fueron fijadas el día siguiente con paraformaldehído (PFA) al 3% durante 15 min a temperatura ambiente (RT). Para hacer a las células permeables, se usó 0,3% de Triton X en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 15 min de incubación a temperatura ambiente, seguida por bloqueo del fondo con bloque de fondo de DAKO durante 20 min a temperatura ambiente, con una cantidad justamente lo suficientemente grande como para cubrir toda la superficie. A continuación todos los multipocillos fueron incubados con anticuerpos primarios (ratón), diluidos a 1:100, de nuevo antígeno temprano inmediato (IEA, Antigene) durante 45 min a 8°C. Subsiguientemente las células fueron incubadas con anticuerpos secundarios, FITC anti-ratón de conejo (Dako Cytomation), diluidos a 1:100, durante 45 min a 8°C y teñidos simultáneamente con DAPI (Sigma), diluidos a 1:250 DAPI es una sustancia química que tiñe el núcleo de las células.

Los testigos positivos y negativos de ambos tipos de célula, fueron tratados, respectivamente, de la forma anterior.

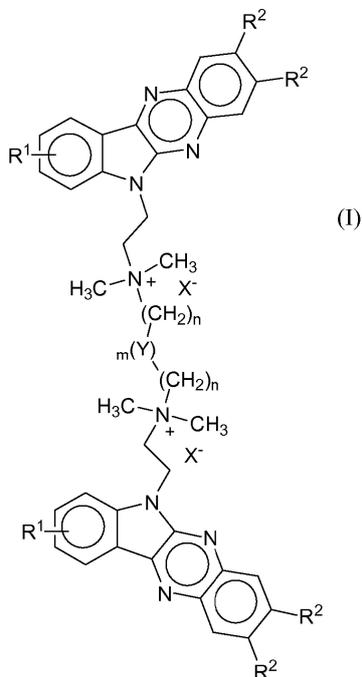
**Análisis por microscopía de inmunofluorescencia.**

30 Las células fueron analizadas mediante microscopía de inmunofluorescencia usando un aparato Nikon Eclipse TE 2000-U. La cantidad de células que expresan IEA, en dos partes diferentes del pocillo, se contó a simple vista y se comparó con la cantidad total de células (indicada con DAPI), en esas mismas partes. Estos valores fueron usados para apreciar el porcentaje de células infectadas en cada pocillo a partir del cual se calculó la cantidad de inhibición conseguida por las diferentes sustancias. Fue elegido este método de calcular el porcentaje de células infectadas en dos partes de un pocillo y después aplicarla a todo el pocillo ya que la cantidad total de células en un pocillo sería imposible de recontar manualmente.

35

REIVINDICACIONES

1<sup>a</sup>. Un compuesto de fórmula (I)

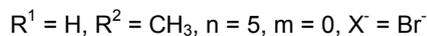
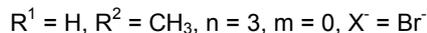


en la que

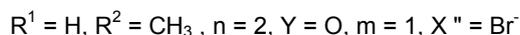
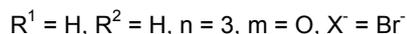
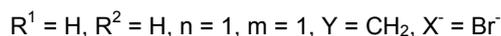
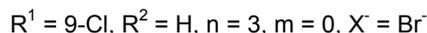
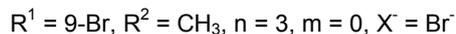
- 5 R<sup>1</sup> se elige entre H, F, Cl, Br, CF<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> y OH;  
R<sup>2</sup> se elige entre H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>;  
n es 1 a 12;  
m es 0 o 1; y  
Y se elige entre CH<sub>2</sub>, NR<sup>3</sup>, (NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sup>+</sup> X<sup>-</sup>, O y S;
- 10 R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se eligen independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>; y  
X<sup>-</sup> se elige entre aniones farmacéuticamente aceptables.
- 2<sup>a</sup>. Un compuesto según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que R<sup>1</sup> se elige entre H, F, Cl, Br, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> y OH.  
3<sup>a</sup>. Un compuesto según la reivindicación 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup>, en el que R<sup>2</sup> se elige entre H y CH<sub>3</sub>.  
4<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 3<sup>a</sup>, en el que X<sup>-</sup> se elige entre Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, metanosulfonato, toluenosulfonato, acetato, citrato y maleato.
- 15 5<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, en el que m es 0.  
6<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, en el que m es 1.  
7<sup>a</sup>. Un compuesto según la reivindicación 6<sup>a</sup>, en el que Y es O.  
8<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup>, en el que n es 4 a 10.

9<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup>, en el que n es 1 a 3.

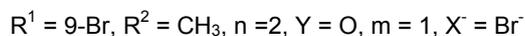
10<sup>a</sup>. Un compuesto según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que



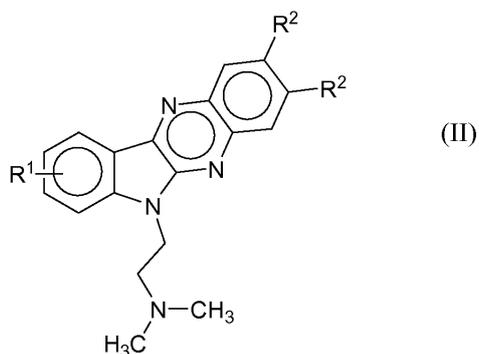
5



10



11<sup>a</sup>. Un método para preparar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup>, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (II)



con un compuesto de fórmula (III)

15  $L(CH_2)_n(Y)_m(CH_2)_nL$  (III)

en la que

$R^1, R^2, Y, m$  y  $n$  son como se han definido antes en el presente texto en relación con la fórmula (I); y

$L$  es un grupo lábil; en un disolvente o una mezcla de disolventes.

20 12<sup>a</sup>. Un método según la reivindicación 11<sup>a</sup>, en el que el grupo lábil se elige entre Cl, Br, metanosulfonilo y toluenosulfonilo.

13<sup>a</sup>. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> para ser usado como producto farmacéutico.

14<sup>a</sup>. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 15<sup>a</sup>. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14<sup>a</sup>, para ser usada como fármaco antiviral.

16<sup>a</sup>. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15<sup>a</sup>, para ser usada como fármaco contra el virus del herpes.

17<sup>a</sup>. Una composición farmacéutica según la reivindicación 16<sup>a</sup>, en la que el virus del herpes es citomegalovirus humano.