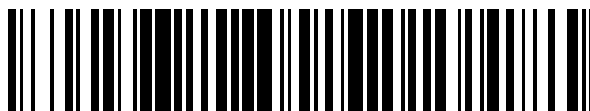


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 249**

51 Int. Cl.:
C07D 403/14 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07776781 .2**
96 Fecha de presentación: **04.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2013200**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **Poliamidas para el tratamiento del virus del papiloma humano**

30 Prioridad:
04.05.2006 US 797426 P
09.03.2007 WO PCT/US2007/006133

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2012

73 Titular/es:
NANOVIR, LLC
4717 CAMPUS DRIVE, SUITE 1300
KALAMAZOO, MI 49008, US

72 Inventor/es:
BASHKIN, James, K.;
KOELLER, Kevin, J.;
EDWARDS, Terri, Grace y
FISHER, Christopher

74 Agente/Representante:
Torner Lasalle, Elisabet

ES 2 387 249 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

Poliamidas para el tratamiento del virus del papiloma humano.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención versa acerca de composiciones de poliamidas y terapias para el tratamiento de células infectadas con el virus del papiloma humano (VPH).

Antecedentes de la invención

10 El virus del papiloma humano es un virus pequeño de ADN bicatenario que coloniza diversos epitelios estratificados como la piel, la mucosa oral y genital e induce la formación de tumores benignos autolimitantes denominados papilomas (verrugas) o condilomas. La mayoría de estos tumores benignos remiten de forma natural debido a la influencia de las defensas inmunológicas del anfitrión. Sin embargo, algunos VPH tienen un potencial oncogénico y han sido asociados con ciertos tipos de cáncer. Véanse Lorincz et al., *Obstetrics & Gynecology*, 79:328-337 (1992); Beaudenon et al., *Nature*, 321:246-249 (1986); y Holloway et al., *Gynecol. Onc.*, 41:123-128 (1991).

15 El VPH es el virus de transmisión sexual más frecuente. Se sabe que más de 35 genotipos de VPH son transmitidos sexualmente, pero un número relativamente pequeño de genotipos explica la mayoría de las infecciones anogenitales. Entre estos tipos más comunes de VPH hay dos formas con alto riesgo de evolución carcinogénica (VPH16 y VPH18), y dos formas que causan la mayoría de las verrugas genitales (VPH6 y VPH11).

20 Se calcula que 5,3 millones de personas se infectan del VPH cada año en Estados Unidos y se calcula que en la actualidad hay 20 millones de estadounidenses infectados (Cates et al., *Lancet*, 354, Suppl. SrV62, 1999). Aproximadamente el 75% de la población masculina y femenina en edad reproductiva ha sido infectada con VPH de transmisión sexual, aunque el principal riesgo para la salud pública es para las mujeres, por el cáncer del cuello de útero (Koutsky, *Am. J. Med.*, 102(5A), 3-8, 1997). Así, millones de personas tan solo en EE. UU. requieren tratamiento cada año. Es importante hacer notar que la prueba de Papanicolau representa el mayor programa exploratorio de salud pública del mundo y que la prueba es, esencialmente, una medida de la infección por VPH. El estándar actual para gestionar una prueba de Papanicolau positiva es el "seguimiento". En general, no se recomienda ningún tratamiento, a no ser que se observe una fase avanzada de displasia cervical (CDC Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2002).

30 Existe una necesidad significativa de fármacos antivirales efectivos contra el VPH en pacientes positivos al VPH. En la actualidad no existe ningún tratamiento específico ni para el VPH ni para las verrugas. Aldara™ (imiquimod), un inmunomodulador inespecífico usado para el tratamiento de verrugas genitales externas, es el tratamiento de más éxito del mercado. Un tratamiento efectivo y específico para el VPH tiene el potencial de superar significativamente y competir de manera efectiva con el imiquimod.

35 La mayoría de los carcinomas humanos del cuello de útero (95%) contienen y expresan ADN de VPH y parece que la expresión de dos oncoproteínas virales, E6 y E7, es crítica para la transformación celular y el mantenimiento del estado transformado. Específicamente, cuatro tipos de VPH (VPH-16, VPH-18, VPH-31 y VPH-45) han sido relacionados con el 75-93% de los casos de cáncer de cuello de útero en Estados Unidos. Se ha calculado que quizá el veinte por ciento (20%) de todas las muertes por cáncer en mujeres del mundo entero son por cánceres que están asociados con el VPH.

En general, los VPH se agrupan en tipos basados en la singularidad de su secuencia de ADN.

40 Los VPH puede ser clasificados ulteriormente de alto o de bajo riesgo con base en las lesiones clínicas con las que están asociados y en la propensión relativa para que estas lesiones evolucionen a cáncer. Los tipos de bajo riesgo, como los tipos de VPH VPH-1, VPH-2, VPH-3, VPH-4, VPH- 5, VPH-7, VPH-8 y VPH-9, causan las verrugas comunes (*verrucae vulgariis*), las verrugas plantares (*verrucae plantaris*), las verrugas en mosaico, las verrugas planas (*verrucae plane*) y las verrugas del carnicero. Además, los tipos de VPH VPH-6 y VPH-11 causan verrugas de los genitales externos, del ano y el cuello de útero. Los tipos de alto riesgo, como VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33 y VPH45, son particularmente comunes en carcinomas intraepiteliales, neoplasias y cánceres. En particular, se ha descubierto que los genomas de dos tipos de VPH, VPH-16 y VPH-18, están asociados con aproximadamente 70 de los carcinomas invasivos del cuello de útero.

50 El tratamiento actual para la infección de VPH es sumamente limitado. Normalmente, la gestión implica la destrucción física de la verruga mediante la extirpación quirúrgica, crioquirúrgica, química o por láser del tejido infectado. Algunos de estos tratamientos actuales, como la extirpación por láser y la cirugía, son caros y requieren el uso de anestesia para dormir el área que va a ser tratada. La extirpación crioquirúrgica requiere el uso de equipo especial. Además, la mayoría de los pacientes experimentan dolor moderado durante el procedimiento y después del mismo.

55 También se han usado cremas y soluciones de uso tópico, como preparados de 5-fluorouracilo, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox y podofilina (Reichman en Harrison's 7

Principles of Internal Medicine, 13^a ed. (Isselbacher et al., eds.), McGraw-Hill, Inc., Nueva York (1993) pp. 801-803). Sin embargo, las recidivas después de estos tratamientos son comunes, debido con mucha probabilidad al hecho de que el virus permanece latente dentro de las células cutáneas. Por lo tanto, deben usarse tratamientos repetitivos subsiguientes, que pueden destruir tejido sano. Estos tratamientos no están disponibles ni autorizados para el tratamiento de infecciones del cuello de útero.

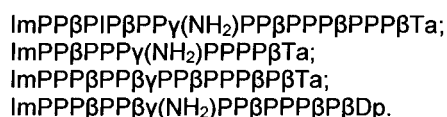
El interferón ha sido hasta ahora el tratamiento más efectivo del VPH; sin embargo, su efectividad es limitada (Chang et al. (2002) Journal of Virology 76: 8964-74, descubrieron que algunas células infectadas con genomas del VPH se volvían resistentes al tratamiento con interferón después de solo algunas aplicaciones). Véanse también Cowser (1994) Intervirology 37:226-230; Bornstein et al. (1993) Obstetrics Gynecol. Sur. 4504:252-260; Browder et al. (1992) Ann. Pharmacother. 26:42-45.

Existe la necesidad de terapias de tratamiento de varias enfermedades y afecciones esbozadas en esta solicitud.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona poliamidas, composiciones de poliamidas y procedimientos para tratar células infectadas con el VPH. En algunas realizaciones, los agentes antivirales de poliamidas son ideales para tratar la papilomatosis laríngea, la displasia y el cáncer de cuello de útero y la papilomatosis respiratoria recurrente (RRP).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula



En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en lo que antecede y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

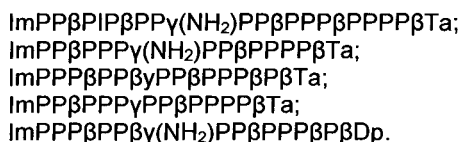
En un aspecto de la realización, la composición comprende, además, un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina.

En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento *in vitro* de células infectadas por VPH que comprende poner a las células en contacto con un compuesto descrito en el presente documento. En un aspecto de la invención, el procedimiento comprende, además, poner a las células en contacto con un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina.

En otra realización adicional, los compuestos de la invención son para el tratamiento de células afectadas por el VPH en un paciente o sujeto mediante la administración a un paciente o sujeto de un compuesto o una composición farmacéutica descritos en el presente documento. El procedimiento comprende, además, poner a las células en contacto con un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina. En otro aspecto, el VPH puede ser VPH11, VPH16, VPH18, VPH 1 o VPH6.

En otras realizaciones, los compuestos son para el tratamiento de células afectadas por el VPH16 administrando a un paciente un compuesto descrito en el presente documento.

En otras realizaciones, la invención proporciona compuestos para el tratamiento de células afectadas por el VPH16 administrando a un paciente un compuesto seleccionado de



El procedimiento comprende, además, la administración de un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina.

Las poliamidas de esta invención presentan una eficacia *in vitro* contra el VPH superior a la del cidofovir o el interferón para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el VPH. Estas enfermedades pueden incluir verrugas genitales o cutáneas, infecciones de VPH de tejidos orales o genitales, incluyendo epitelios del cuello de útero, cáncer anal, lesiones neoplásicas o hiperproliferativas causadas por el VPH, papilomas conjuntivales, *condylomata acuminata* y papilomatosis respiratoria recurrente (RRP).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 compara el efecto del cidofovir y el INF γ con dos poliamidas en el número de copias del VPH16.

La Figura 2A muestra un gráfico representativo de los resultados de Q-PCR para determinar la CI_{50} de las poliamidas. La Fig. 2B muestra la disminución dependiente de la dosis en el número de copias de ADN de VPH 16 en células tratadas con poliamidas y el efecto de las poliamidas en la viabilidad celular.

La Figura 3 muestra un gráfico que presenta el efecto dependiente de la dosis de las poliamidas en episomas de VPH 16.

La Figura 4 muestra una transferencia de Southern de eliminación del ADN de VPH por poliamidas.

La Figura 5 compara la eficacia de concentraciones variables de la poliamida 1037 con respecto a las de la distamicina A y el cidofovir en el número de copias de VPH 16 y el efecto correspondiente de cada uno en la viabilidad celular.

La Figura 6 muestra la estructura química de una poliamida ejemplar.

La Figura 7 muestra el efecto de la retirada de una poliamida de queratinocitos en episomas de VPH 16.

La Figura 8 es un diagrama de diferentes motivos de enlace de poliamidas.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a no ser que se indique otra cosa.

Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican según la tabla periódica de los elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75^a ed. Además, se describen principios generales de química orgánica en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y en "March's Advanced Organic Chemistry", 5^a ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

Tal como se usa en el presente documento, el término "alifático" abarca los términos alquilo, alquenilo, alquinilo, estando sustituido cada uno de los cuales según se expone en lo que sigue.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburos alifáticos saturados que contiene 1-8 (por ejemplo, 1-6 o 1-4) átomos de carbono. Un grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, n-heptilo o 2-etilhexilo. Un grupo alquilo puede ser sustituido (es decir, opcionalmente sustituido) con uno o más sustituyentes, como halo; cicloalifáticos [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalquenilo]; heterocicloalifáticos [por ejemplo, heterocicloalquilo o heterocicloalquenilo]; arilo; heteroarilo; alcoxi; aroilo; heteroarilo; acilo [por ejemplo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo o (heterocicloalifático)carbonilo]; nitro; ciano; amido [por ejemplo, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heteocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo o heteroarilaminocarbonilo]; amino [por ejemplo, aminoalifático, aminocicloalifático o aminoheterocicloalifático]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-S(O)₂-]; sulfinilo; sulfanilo; sulfoxi; urea, tiourea, sulfamoilo; sulfamida; oxo; carboxi; carbamoilo; oxicicloalifático; oxiheterocicloalifático; ariloxi; heteroariloxi; aralquiloxi; heteroarilalcoxi; alcoxycarbonilo; alquilcarboniloxi o hidroxil. Sin limitación, algunos ejemplos de alquilos sustituidos incluyen carboxialquilo (tal como HOOC-alquilo, alcoxycarbonilalquilo y alquilcarboniloxialquilo); cianoalquilo; hidroxialquilo; alquilo; acilalquilo; aralquilo; (alcoxiaril)alquilo; (sulfonilamino)alquilo (tal como alquil-S(O)₂-aminoalquilo); aminoalquilo; amidoalquilo; (cicloalifático)alquilo; o haloalquilo.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo halo-alifático se refiere a un grupo alifático que está sustituido con 1-3 átomos halo, estando definidos alifático y halo en el presente documento. La sustitución puede ocurrir en cualquier átomo de carbono químicamente viable.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "alquenilo" se refiere a un grupo de hidrocarburos alifáticos que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-6 o 2-4) átomos de carbono y al menos un doble enlace. Como un grupo alquilo, un grupo alquenilo puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de un grupo alquenilo incluyen, sin limitación, alilo, isoprenilo, 2-butenilo y 2-hexenilo. Un grupo alquenilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, como halo; cicloalifáticos [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalquenilo]; heterocicloalifáticos [por ejemplo, heterocicloalquilo o heterocicloalquenilo]; arilo; heteroarilo; alcoxi; aroilo; heteroarilo; acilo [por ejemplo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo o (heterocicloalifático)carbonilo]; nitro; ciano; amido [por ejemplo, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino,

(heteocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo o heteroarilaminocarbonilo]; amino [por ejemplo, aminoalifático, aminocicloalifático o aminoheterocicloalifático]; sulfonilo [por ejemplo, alquil-S(O)₂-, cicloalifático-S(O)₂- o aril-S(O)₂-]; sulfínilo; sulfoxi; urea, tiourea, sulfamoilo; sulfamida; oxo; carboxi; carbamoilo; oxicicloalifático; oxiheterocicloalifático; ariloxi; heteroariloxi; aralquiloxi; heteroarilalcoxi; alcoxicarbonilo; alquilcarboniloxi o hidroxil. Sin limitación, algunos ejemplos de alquénilos sustituidos incluyen cianoalquénilo, alcoxi-alquénilo, acilalquénilo, hidroxialquénilo, aralquénilo, (alcoxiaril)alquénilo, (sulfonilamino)alquénilo (tal como alquil-S(O)₂-aminoalquénilo), aminoalquénilo, amidoalquénilo, (cicloalifático)alquénilo o haloalquénilo.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "alquinilo" se refiere a un grupo de hidrocarburos alifáticos que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-6 o 2-4) átomos de carbono y tiene al menos un triple enlace. Un grupo alquinilo puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de un grupo alquinilo incluyen, sin limitación, propargilo y butinilo. Un grupo alquinilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, como aroilo; heteroarilo; alcoxi; cicloalquiloxi; heterocicloalquiloxi; ariloxi; heteroariloxi; aralquiloxi; nitro; carboxi; ciano; halo; hidroxil; sulfo; mercapto; sulfanilo [por ejemplo, alifático-S- o cicloalifático-S-]; sulfínilo [por ejemplo, alifático-S(O)- o cicloalifático-S(O)-]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-S(O)₂-, aminoalifático-S(O)₂- o cicloalifático-S(O)₂-]; amido [por ejemplo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, cicloalquilcarbonilamino, arilaminocarbonilo, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino o heteroarilaminocarbonilo]; urea, tiourea, sulfamoilo; sulfamida; alcoxicarbonilo; alquilcarboniloxi; cicloalifáticos; heterocicloalifáticos; arilo; heteroarilo; acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo o (heterocicloalifático)carbonilo]; amino [por ejemplo, aminoalifático]; sulfoxi; oxo; carbamoilo; oxil(cicloalifático); oxil(heterocicloalifático); (heteroaril)alcoxi.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "amido" abarca tanto "aminocarbonilo" como "carbonilamino". Cuando se usan solos o en conexión con otro grupo, estos términos se refieren a un grupo amido como -N(R^X)-C(O)-R^Y o -C(O)-N(R^X)₂, cuando se usan terminalmente, y -C(O)-N(R^X)- o -N(R^X)-C(O)- cuando se usan internamente, estando definidos R^X y R^Y más abajo. Ejemplos de grupos amido incluyen alquilamido (tales como alquilcarbonilamino o alquilaminocarbonilo), (heterocicloalifático)amido, (heteroaril)amido, (heteroaril)amido, (heterocicloalquil)alquilamido, arilamido, aralquilamido, (cicloalquil)alquilamido o cicloalquilamido.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "amino" se refiere a -NR^XR^Y, siendo cada uno de R^X y R^Y, independientemente, hidrógeno, alquilo, cicloalifático, (cicloalifático)alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático)alifático, heteroarilo, carboxi, sulfanilo, sulfínilo, sulfonilo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, arilcarbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo, (heteroaril)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo, cada uno de los cuales está definido en el presente documento y está opcionalmente sustituido. Ejemplos de grupos amino incluyen alquilamino, dialquilamino o arilamino. Cuando el término "amino" no es el grupo terminal (por ejemplo, alquilcarbonilamino), está representado por -NX-. R^X tiene el mismo significado que se ha definido en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "arilo", usado solo o como parte de un resto mayor, como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillos monocíclicos (por ejemplo, fenilo), bicíclicos (por ejemplo, indenilo, naftalenilo, tetrahidronaftilo, tetrahidroindenilo) y tricíclicos (por ejemplo, fluorenilo, tetrahydrofluorenilo, o tetrahydroantraceniilo, antraceniilo) en los que el sistema de anillo monocíclico es aromático o al menos uno de los anillos en un sistema de anillos bicíclicos o tricíclicos es aromático. Los grupos bicíclicos y tricíclicos incluyen anillos carbocíclicos benzofusionados de 2-3 miembros. Por ejemplo, un grupo benzofusionado incluye fenilo fusionado con dos o más restos carbocíclicos C₄₋₈. Un arilo es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes que incluyen alifáticos [por ejemplo, alquilo, alquénilo o alquinilo]; cicloalifáticos; (cicloalifático)alifáticos; heterocicloalifáticos; (heterocicloalifático)alifáticos; arilo; heteroarilo; alcoxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroarilo; amino; oxil (en un anillo carbocíclico no aromático de un arilo bicíclico o tricíclico benzofusionado); nitro; carboxi; amido; acilo [por ejemplo, alifáticocarbonilo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo o (heteroaril)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-S(O)₂- o amino-S(O)₂-]; sulfínilo [por ejemplo, alifático-S(O)- o cicloalifático-S(O)-]; sulfanilo [por ejemplo, alifático-S-]; ciano; halo; hidroxil; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida o carbamoilo. Alternativamente, un arilo puede no estar sustituido.

Ejemplos no limitantes de arilos sustituidos incluyen haloarilo (por ejemplo, mono, di (tal como *p,m*-dihaloarilo) y (trihalo)arilo]; (carboxi)arilo [por ejemplo, (alcoxicarbonil)arilo, ((aralquil)carboniloxi)arilo, y (alcoxicarbonil)arilo]; (amido)arilo [por ejemplo, (aminocarbonil)arilo, (((alquilamino)alquil)aminocarbonil)arilo, (alquilcarbonil)aminoarilo, (arilaminocarbonil)arilo y (((heteroaril)amino)carbonil)arilo]; aminoarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)arilo o ((dialquil)amino)arilo]; (cianoalquil)arilo; (alcoxi)arilo; (sulfamoil)arilo [por ejemplo, (aminosulfonil)arilo]; (alquilsulfonil)arilo; (ciano)arilo; (hidroxialquil)arilo; ((alcoxi)alquil)arilo; (hidroxil)arilo, ((carboxi)alquil)arilo; (((dialquil)amino)alquil)arilo; (nitroalquil)arilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)arilo; ((heterocicloalifático)carbonil)arilo;

((alquilsulfonil)alquil)arilo; (cianoalquil)arilo; (hidroxialquil)arilo; (alquilcarbonil)arilo; alquilarilo; (trihaloalquil)arilo; *p*-amino-*m*-alcoxicarbonilarilo; *p*-amino-*m*-cianoarilo; *p*-halo-*m*-aminoarilo; o (*m*-(heterocicloalifático)-*o*-(alquil))arilo.

5 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "aralifático", tal como un "aralquilo", se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, grupo alquilo C₁₋₄) que está sustituido con un grupo arilo. "Alifático", "alquilo" y "arilo" están definidos en el presente documento. Un ejemplo de un grupo aralifático, tal como un aralquilo, es el bencilo.

10 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₄) que está sustituido con un grupo arilo. Tanto "alquilo" como "arilo" han sido definidos en lo que antecede. Un ejemplo de un grupo aralquilo es el bencilo. Un aralquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifáticos [por ejemplo, alquilo, alquenilo o alquinilo, incluyendo carboxialquilo, hidroxialquilo o haloalquilo, tal como trifluorometilo]; cicloalifáticos [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalquenilo]; (cicloalquil)alquilo; heterocicloalquilo; (heterocicloalquil)alquilo; arilo; heteroarilo; alcoxi; cicloalquiloxi; heterocicloalquiloxi; ariloxi; heteroariloxi; aralquiloxi; heteroaralquiloxi; aroilo; heteroaroiilo; nitro; carboxi; alcoxicarbonilo; alquilcarboniloxi; amido [por ejemplo, aminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilcarbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino o heteroaralquilcarbonilamino]; ciano; halo; hidroxil; acilo; mercapto; alquilsulfanilo; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; oxo; o carbamoilo.

20 Tal como se usa en el presente documento, un "sistema de anillos bicíclicos" incluye estructuras de 8-12 miembros (por ejemplo, 9, 10 u 11) que forman dos anillos, teniendo los dos anillos al menos un átomo en común (por ejemplo, 2 átomos en común). Los sistemas de anillos bicíclicos incluyen los bicicloalifáticos (por ejemplo, bicicloalquilo o bicicloalquenilo), los bicicloheteroalifáticos, los arilos bicíclicos y los heteroarilos bicíclicos.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "cicloalifático" abarca un grupo "cicloalquilo" y un grupo "cicloalquenilo", estando sustituido opcionalmente cada uno de los cuales según se expone en lo que sigue.

25 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico saturado mono o bicíclico (fusionado o puenteado) de 3-10 (por ejemplo, 5-10) átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, norbornilo, cubilo, octahidroindenilo, decahidronaftilo, biciclo[3-2.1]octilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[3.3.1]nonilo, biciclo[3.3.2]decilo, biciclo[2.2.2]octilo, adamantilo, azacicloalquilo o ((aminocarbonil)cicloalquil)cicloalquilo. Un grupo "cicloalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo carbocíclico no aromático de 3-10 (por ejemplo, 4-8) átomos de carbono que tiene uno o más enlaces dobles. Ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, 1,4-ciclohexa-dienilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, hexahidroindenilo, octahidronaftilo, ciclohexenilo, ciclopentenilo, biciclo[2.2.2]octenilo o biciclo[3.3.1]nonenilo. Un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo puede ser opcionalmente sustituido con uno más sustituyentes, tales como alifáticos [por ejemplo, alquilo, alquenilo o alquinilo]; cicloalifáticos; (cicloalifático)alifáticos; heterocicloalifáticos; (heterocicloalifático)alifáticos; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroaroiilo; amino; amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático)carbonilamino, ((cicloalifático)alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino, (heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino o (heteroaralifático)carbonilamino]; nitro; carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxicarbonilo o alquilcarboniloxi]; acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo]; ciano; halo; hidroxil; mercapto; sulfonilo [por ejemplo, alquil-S(O)₂- y aril-S(O)₂-]; sulfinilo [por ejemplo, alquil-S(O)-]; sulfanilo [por ejemplo, alquil-S-]; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; oxo; o carbamoilo.

Tal como se usa en el presente documento, "resto cíclico" incluye cicloalifáticos, heterocicloalifáticos, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales ha sido definido previamente.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "heterocicloalifático" abarca un grupo heterocicloalquilo y un grupo heterocicloalquenilo, estando opcionalmente sustituido cada uno de los cuales según se expone en lo que sigue.

50 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "heterocicloalquilo" se refiere a una estructura saturada en anillo mono o bicíclica de 3-10 miembros (fusionada o puenteada) (por ejemplo, mono o bicíclica de 5 a 10 miembros), en la que uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S o combinaciones de los mismos). Ejemplos de un grupo heterocicloalquilo incluyen piperidilo, piperazilo, tetrahidropirano, tetrahydrofurilo, 1,4-dioxolanilo, 1,4-ditianilo, 1,3-dioxolanilo, oxazolidilo, isoxazolidilo, morfolinilo, tiomorfolilo, octahidrobenzofurilo, octahidrocromenilo, octahidrotiocromenilo, octahidroindolilo, octahidropirindinilo, decahidroquinolinilo, octahidrobencob[*b*]tiofenilo, 2-oxa-biciclo[2.2.2]octilo, 1-aza-biciclo[2.2.2]octilo, 3-aza-biciclo[3.2.1]octilo y 2,6-dioxa-triciclo[3.3.1.0^{3,7}]nonilo. Un grupo heterocicloalquilo monocíclico puede fusionarse con un resto fenílico para formar un heteroarilo como la tetrahydroisoquinolina. Un grupo "heterocicloalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de anillo no aromático mono o bicíclico (por ejemplo, mono o bicíclico de 5 a 10 miembros) que tiene uno o más enlaces dobles y en la que uno o más de los átomos del

anillo son heteroátomos (por ejemplo, N, O o S). Los monocíclicos y los bicicloheteroalifáticos se numeran según la nomenclatura química estándar.

5 Un grupo heterocicloalquilo o heterocicloalqueno puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifáticos [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino]; cicloalifáticos; (cicloalifático)alifáticos; heterocicloalifáticos; (heterocicloalifático)alifáticos; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroarilo; amino; amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático)carbonilamino, ((cicloalifático)alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino, (heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino o (heteroaralifático)carbonilamino]; nitro; carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxycarbonilo o alquilcarboniloxi]; acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo]; nitro; ciano; halo; hidroxilo; mercapto; sulfonilo [por ejemplo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo]; sulfinilo [por ejemplo, alquilsulfinilo]; sulfanilo [por ejemplo, alquilsulfanilo]; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; oxo; o carbamoilo.

15 Un grupo "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o tricíclico que tiene de 4 a 15 átomos en anillo en el que uno o más de los átomos del anillo son heteroátomos (por ejemplo, N, O, S o combinaciones de los mismos) y en el que el sistema de anillos monocíclico es aromático o al menos uno de los anillos en los sistemas bicíclicos o tricíclicos es aromático. Un grupo heteroarilo incluye un sistema de anillos benzofusionado que tiene 2 o 3 anillos. Por ejemplo, un grupo benzofusionado incluye los benzofusionados con uno o dos restos heterocicloalifáticos de 4 a 8 miembros (por ejemplo, indolizilo, indolilo, 20 isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, quinolinilo o isoquinolinilo). Algunos ejemplos de heteroarilo son azetidilo, piridilo, 1H-indazolilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, oxazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofurilo, isoquinolinilo, bencitiazolilo, xanteno, tioxanteno, fenotiazina, dihidroindol, benzo[1,3]dioxol, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, bencitiazolilo, purilo, cinolilo, quinolilo, quinazolilo, cinolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, isoquinolilo, 4H-quinolizilo, benzo-1,2,5-tiadiazolilo o 1,8-naftiridilo.

25 Sin limitación, los heteroarilos monocíclicos incluyen furilo, tiofenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 2H-piranilo, 4-H-piranilo, piridilo, piridazilo, pirimidilo, pirazolilo, pirazilo o 1,3,5-triazilo. Los heteroarilos monocíclicos se numeran según la nomenclatura química estándar.

30 Sin limitación, los heteroarilos bicíclicos incluyen indolizilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolizilo, isoindolilo, indolilo, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, bencitiazolilo, purinilo, 4H-quinolizilo, quinolilo, isoquinolilo, cinolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, 1,8-naftiridilo o pteridilo. Los heteroarilos bicíclicos se numeran según la nomenclatura química estándar.

35 Un heteroarilo es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como los alifáticos [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino]; cicloalifáticos; (cicloalifático)alifáticos; heterocicloalifáticos; (heterocicloalifático)alifáticos; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroarilo; amino; oxo (en un anillo no aromático carbocíclico o heterocíclico de un heteroarilo bicíclico o tricíclico); carboxi; amido; acilo [por ejemplo, alifaticocarbonilo; (cicloalifático)carbonilo; ((cicloalifático)alifático)carbonilo; (aralifático)carbonilo; (heterocicloalifático)carbonilo; ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo; o (heteroaralifático)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-S(O)₂- o amino-S(O)₂-]; sulfinilo [por ejemplo, alifático-S(O)-]; sulfanilo [por ejemplo, alifático-S-]; nitro; ciano; halo; hidroxilo; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; o carbamoilo. Alternativamente, un heteroarilo puede no ser sustituido.

45 Ejemplos no limitantes de heteroarilos sustituidos incluyen (halo)heteroarilo [por ejemplo, mono y di-(halo)heteroarilo]; (carboxi)heteroarilo [por ejemplo, (alcoxycarbonil)heteroarilo]; cianoheteroarilo; aminoheteroarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)heteroarilo y ((dialquil)amino)heteroarilo]; (amido)heteroarilo [por ejemplo, aminocarbonilheteroarilo, ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo, (((alquil)amino)alquil)aminocarbonilheteroarilo, (((heteroaril)amino)carbonil)heteroarilo, ((heterocicloalifático)carbonil)heteroarilo, y ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo]; (cianoalquil)heteroarilo; (alcoxi)heteroarilo; (sulfamoil)heteroarilo [por ejemplo, (aminosulfonil)heteroarilo]; (sulfonil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilsulfonil)heteroarilo]; (hidroxialquil)heteroarilo; (alcoxialquil)heteroarilo; (hidroxil)heteroarilo; ((carboxi)alquil)heteroarilo; (((dialquil)amino)amino)alquilheteroarilo; (heterocicloalifático)heteroarilo; (cicloalifático)heteroarilo; (nitroalquil)heteroarilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)heteroarilo; ((alquilsulfonil)alquil)heteroarilo; (cianoalquil)heteroarilo; (acil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilcarbonil)heteroarilo]; (alquil)heteroarilo y (haloalquil)heteroarilo [por ejemplo, trihaloalquilheteroarilo].

55 Un grupo "heteroaralifático" (tal como un grupo heteroaralquilo), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₄) que está sustituido con un grupo heteroarilo. "Alifático," "alquilo," y "heteroarilo" han sido definidos en lo que antecede.

Un grupo "heteroaralquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₄) que está sustituido con un grupo heteroarilo. Tanto "alquilo" como "heteroarilo" han sido definidos en lo que antecede. Un heteroaralquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alquilo (por ejemplo, carboxialquilo, hidroxialquilo y haloalquilo tal como trifluorometilo); alqueno; alquino; cicloalquilo;

(cicloalquil)alquilo; heterocicloalquilo; (heterocicloalquil)alquilo; arilo; heteroarilo; alcoxi; cicloalquiloxi; heterocicloalquiloxi; ariloxi; heteroariloxi; aralquiloxi; heteroaralquiloxi; aroilo; heteroarilo; nitro; carboxi; alcóxicarbonilo; alquilcarboniloxi; aminocarbonilo; alquilcarbonilamino; cicloalquilcarbonilamino; (cicloalquilalquil)carbonilamino; arilcarbonilamino; aralquilcarbonilamino; (heterocicloalquil)carbonilamino; (heterocicloalquilalquil)carbonilamino; heteroarilcarbonilamino; heteroaralquilcarbonilamino; ciano; halo; hidroxí; acilo; mercapto; alquilsulfanilo; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; oxo; o carbamoilo.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "acilo" se refiere a un grupo formilo o $R^X-C(O)$ (tal como -alquil-C(O)-, también denominado "alquilcarbonilo"), en el que R^X y "alquilo" han sido definidos previamente. Acetilo y pivaloilo son ejemplos de grupos acilo.

10 Tal como se usa en el presente documento, un "arilo" o "heteroarilo" se refiere a un aril-C(O)- o a un heteroaril-C(O)-. La porción arilo y heteroarilo del aroilo o el heteroarilo está opcionalmente sustituida, tal como se ha definido previamente.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "alcoxi" se refiere a un grupo alquil-O-, en el que "alquilo" ha sido definido previamente.

15 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "carbamoilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura -O-CO-NR^XR^Y o -NR^X-CO-O-R^Z, en las que R^X y R^Y han sido definidas en lo que antecede y R^Z puede ser alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, heteroarilo o heteroaralifático.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "carboxi" se refiere a -COOH, -COOR^X, -OC(O)H, -OC(O)R^X cuando se usa como grupo terminal; o a -OC(O)- o -C(O)O- cuando se usa como grupo interno.

20 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "haloalifático" se refiere a un grupo alifático sustituido con 1-3 halógenos. Por ejemplo, el término haloalquilo incluye el grupo -CF₃.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "mercapto" se refiere a -SH.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfo" se refiere a -SO₃H o -SO₃R^X cuando se usa terminalmente o a -S(O)₃- cuando se usa internamente.

25 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfamida" se refiere a la estructura -NR^X-S(O)₂-NR^YR^Z cuando se usa terminalmente y a NR^X-S(O)₂-NR^Y- cuando se usa internamente, habiendo sido definidas R^X , R^Y y R^Z en lo que antecede.

30 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfamoilo" se refiere a la estructura -S(O)₂-NR^XR^Y o -NR^X-S(O)₂-R^Z cuando se usa terminalmente; o a -S(O)₂-NR^X- o -NR^X-S(O)₂- cuando se usa internamente, habiendo sido definidas R^X , R^Y y R^Z en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfanilo" se refiere a -S-R^X cuando se usa terminalmente y a -S- cuando se usa internamente, habiendo sido definida R^X en lo que antecede. Ejemplos de sulfanilos incluyen alifático-S-, cicloalifático-S-, aril-S- o similares.

35 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfinilo" se refiere a -S(O)-R^X cuando se usa terminalmente y a -S(O)- cuando se usa internamente, habiendo sido definida R^X en lo que antecede. Grupos sulfinilo ejemplares incluyen alifático-S(O)-, aril-S(O)-, (cicloalifático(alifático))-S(O)-, cicloalquil-S(O)-, heterocicloalifático-S(O)-, heteroaril-S(O)- o similares.

40 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfonilo" se refiere a -S(O)₂-R^X cuando se usa terminalmente y a -S(O)₂- cuando se usa internamente, habiendo sido definida R^X en lo que antecede. Grupos sulfonilo ejemplares incluyen alifático-S(O)₂-, aril-S(O)₂-, (cicloalifático(alifático))-S(O)₂-, cicloalifático-S(O)₂-, heterocicloalifático-S(O)₂-, heteroaril-S(O)₂-, (cicloalifático(amido(alifático)))-S(O)₂- o similares.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "sulfoxi" se refiere a -O-SO-R^X o -SO-O-R^X, cuando se usa terminalmente y a -O-S(O)- o -S(O)-O- cuando se usa internamente, habiendo sido definida R^X en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

45 Tal como se usa en el presente documento, un "alcóxicarbonilo," que está abarcado por el término carboxi, usado solo o en conexión con otro grupo, se refiere a un grupo tal como alquil-O-C(O)-.

Tal como se usa en el presente documento, un "alcoxilalquilo" se refiere a un grupo alquilo, tal como alquil-O-alquil-, habiendo sido definido alquilo en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, un "carbonilo" se refiere a -C(O)-.

50 Tal como se usa en el presente documento, un "oxo" se refiere a =O.

Tal como se usa en el presente documento, un "aminoalquilo" se refiere a la estructura $(R^X)_2N$ -alquil-.

Tal como se usa en el presente documento, un "cianoalquilo" se refiere a la estructura (NC) -alquil-.

5 Tal como se usa en el presente documento, un grupo "urea" se refiere a la estructura $-NR^X-CO-NR^YR^Z$ y un grupo "tiourea" se refiere a la estructura $-NR^X-CS-NR^YR^Z$ cuando se usa terminalmente y a $-NR^X-CO-NR^Y-$ o $-NR^X-CS-NR^Y-$ cuando se usa internamente, habiendo sido definidas R^X , R^Y y R^Z en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, un grupo "guanidina" se refiere a la estructura $-N=C(N(R^X)R^Y)N(R^XR^Y)$, habiendo sido definidas R^X y R^Y en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, el término "amidino" se refiere a la estructura $-C=(NR^X)N(R^XR^Y)$, habiendo sido definidas R^X y R^Y en lo que antecede.

10 En general, el término "vecinal" se refiere a la colocación de sustituyentes en un grupo que incluye dos o más átomos de carbono, en la que los sustituyentes están unidos a átomos de carbono adyacentes.

En general, el término "geminal" se refiere a la colocación de sustituyentes en un grupo que incluye dos o más átomos de carbono, en la que los sustituyentes están unidos al mismo átomo de carbono.

15 Los términos "terminalmente" e "internamente" se refieren a la ubicación de un grupo dentro de un sustituyente. Un grupo es terminal cuando el grupo está presente al final del sustituyente, no enlazado adicionalmente al resto de la estructura química. El carboxialquilo, o sea, $RXO(O)C$ -alquilo, es un ejemplo de un grupo carboxi usado terminalmente. Un grupo es interno cuando el grupo está presente en medio de un sustituyente hasta el final del sustituyente enlazado al resto de la estructura química. El alquilcarboxi (por ejemplo, alquil- $C(O)O-$ o alquil- $OC(O)-$) y el alquilcarboxiarilo (por ejemplo, alquil- $C(O)O$ -aril- o alquil- $O(CO)$ -aril-) son ejemplos de grupos carboxi usados internamente.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término grupo "amidino" se refiere a la estructura $-C=(NR^X)N(R^XR^Y)$ habiendo sido definidas R^X y R^Y en lo que antecede.

Tal como se usa en el presente documento, "grupo cíclico" incluye sistemas de anillos mono, bi y tricíclicos que incluyen cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales ha sido definido previamente.

25 Tal como se usa en el presente documento, un "sistema de anillos bicíclicos puenteados" se refiere a un sistema de anillos heterocicloalifáticos bicíclicos o a un sistema de anillos cicloalifáticos bicíclicos en los que los anillos están puenteados. Ejemplos de sistemas de anillos bicíclicos puenteados incluyen, sin limitación, adamantanilo, norbornanilo, biciclo[3.2.1]octilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[3.3.1]nonilo, biciclo[3.2.3]nonilo, 2-oxa-biciclo[2.2.2]octilo, 1-aza-biciclo[2.2.2]octilo, 3-aza-biciclo[3.2.1]octilo y 2,6-dioxa-triciclo[3-3.1.0^{3,7}]nonilo. Un sistema de anillos bicíclicos puenteados puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alquilo (incluyendo carboxialquilo, hidroxialquilo y haloalquilo, tal como trifluorometilo), alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterocicloalquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalquiloxi, heterocicloalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquiloxi, heteroaralquiloxi, arilo, heteroarilo, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi, aminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilcarbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil) carbonilamino, (heterocicloalquilalquilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, ciano, halo, hidroxi, acilo, mercapto, alquilsulfanilo, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo o carbamoilo.

40 Tal como se usa en el presente documento, una "cadena alifática" se refiere a un grupo alifático ramificado o lineal (por ejemplo, grupos alquilo, grupos alquenilo o grupos alquinilo). Una cadena alifática lineal tiene la estructura $-[CH_2]_v-$, siendo v 1-6. Una cadena alifática ramificada es una cadena alifática lineal que está sustituida con uno o más grupos alifáticos. Una cadena alifática ramificada tiene la estructura $-[CHQ]_v-$, siendo Q hidrógeno o un grupo alifático; sin embargo, Q será un grupo alifático en al menos un caso. La expresión cadena alifática incluye cadenas alquilo, cadenas alquenilo y cadenas alquinilo, habiendo sido definidos alquilo, alquenilo y alquinilo en lo que antecede.

45 La expresión "opcionalmente sustituido" se usa de forma intercambiable con la expresión "sustituido o no sustituido". Tal como se describe en el presente documento, los compuestos de la divulgación pueden ser opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tal como se ilustra en general en lo que antecede, o como se ejemplifica por clases, subclases y especies particulares de la invención. Tal como se describe en el presente documento, las variables contenidas en el presente documento abarcan grupos específicos, tales como alquilo y arilo. A no ser que se haga notar otra cosa, cada uno de los grupos específicos puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento. Cada sustituyente de un grupo específico está opcionalmente sustituido adicionalmente con de uno a tres de halo, ciano, oxoalcoxi, hidroxi, amino, nitro, arilo, haloalquilo y alquilo. Por ejemplo, un grupo alquilo puede ser sustituido con alquilsulfanilo y el alquilsulfanilo, a su vez, puede ser opcionalmente sustituido con de uno a tres de halo, ciano, oxoalcoxi, hidroxi, amino, nitro, arilo, haloalquilo y alquilo.

50 Como ejemplo adicional, la porción de cicloalquilo de un (cicloalquil)carbonilamino puede ser opcionalmente

sustituida con de uno a tres de halo, ciano, alcoxi, hidroxilo, nitro, haloalquilo y alquilo. Cuando dos grupos alcoxi están enlazados al mismo átomo o a átomos adyacentes, los dos grupos alcoxi pueden formar un anillo junto con el o los átomos a los que están enlazados.

En general, el término "sustituido," ya esté precedido o no por el término "opcionalmente", se refiere a la sustitución de radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado. Se describen sustituyentes específicos en lo que antecede en las definiciones y en lo que sigue en la descripción de compuestos y ejemplos de los mismos. A no ser que se indique otra cosa, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede ser sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo en cada posición o diferente. Un sustituyente en anillo, tal como un heterocicloalquilo, puede enlazarse con otro anillo, tal como un cicloalquilo, para formar un sistema de anillos espirobicíclicos, compartiendo ambos anillos, por ejemplo, un átomo común. Como reconocerá una persona con un dominio normal de la técnica, las combinaciones de sustituyentes contemplados por esta divulgación son aquellas combinaciones que resulten en la formación de compuestos estables o químicamente viables.

La expresión "estables o químicamente viables", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no son sustancialmente alterados cuando son sometidos a condiciones que permitan su producción, detección y, preferentemente, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines dados a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, un compuesto estable o un compuesto químicamente viable es aquel que no es sustancialmente alterado cuando se lo mantiene a una temperatura de 40°C o menos, en ausencia de humedad o de otras condiciones químicamente reactivas, durante al menos una semana. Los compuestos de esta invención pueden funcionar en formas protonadas (catiónicas) y pueden cruzar membranas con formas neutras.

Tal como se usa en el presente documento, se define una cantidad efectiva como la cantidad requerida para conferir un efecto terapéutico al paciente tratado, y típicamente se determina con base en la edad, el área superficial, el peso y la condición del paciente. La interrelación de dosis para animales y seres humanos (basadas en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se describe en Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.*, 50: 219 (1966). El área superficial del cuerpo puede ser determinada aproximadamente a partir de la altura y el peso del paciente. Véase, por ejemplo, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, Nueva York, 537 (1970). Tal como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano.

A no ser que se afirme otra cosa, también se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan todas las formas isómeras (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros (Z) y (E) de doble enlace, e isómeros (Z) y (E) conformacionales. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A no ser que se afirme otra cosa, todas las formas tautomerías de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Además, a no ser que se afirme otra cosa, también se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, están dentro del alcance de esta invención los compuestos que tengan las presentes estructuras salvo en la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido de ¹³C o ¹⁴C. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas o sondas analíticas en ensayos biológicos.

II. Antecedentes químicos

Pueden usarse ciertos oligómeros de heterociclos de nitrógeno para enlazarse en regiones particulares de ADN bicatenario. En particular, el N-metil imidazol (I), el des-amino-N-metil imidazol (Im) y el N-metil pirrol (P) tienen una afinidad específica por bases particulares. Esta especificidad puede ser modificada con base en el orden en el que se enlazan estos compuestos. Se ha demostrado que hay especificidad, porque G/C está complementada por Im/P o I/P, C/G está complementada por P/Im o P/I, y A/T y T/A están complementadas se forma redundante por P/P.

De hecho, el N-metil imidazol y el des-amino-N-metil imidazol tienden a estar asociados con guanina, mientras que el N-metil pirrol está asociado con citosina, adenina y timina. Proporcionando dos cadenas de los heterociclos, como 1 o 2 moléculas, se forma un complejo 2:1 con ADN bicatenario, con dos cadenas del antiparalelo oligomérico, en las que los pares G/C tienen Im/P o I/P en yuxtaposición, los pares C/G tienen P/Im o P/I, y los pares T/A tienen P/P en yuxtaposición. Los oligómeros heterocíclicos se unen a grupos amida (carbamilo), en los que los NH pueden participar en el enlace del hidrógeno con electrones de nitrógeno no apareados, particularmente de adenina.

Pueden sintetizarse poliamidas para formar compuestos en horquilla incorporando compuestos, tales como ácido gamma-aminobutírico (γ) o ácido gamma-amino-beta-aminobutírico (γ NH₂), para permitir que una sola poliamida forme un complejo con ADN. Se ha descubierto que tal estructura aumenta significativamente la afinidad de enlace de la poliamida a una secuencia de acceso de ADN.

La beta-alanina (β) puede sustituir un par de grupos N-metil pirrol cuando un par base AT o TA es la secuencia de acceso. La flexibilidad añadida de la beta-alanina puede contribuir a que toda la poliamida esté "alineada" con la secuencia de acceso de ADN.

En algunas realizaciones, la molécula de poliamida comienza con des-amino-N-metil imidazol, que tiene una afinidad específica por la guanósina. En otras realizaciones, la molécula de poliamida termina con 3-(dimetilamino) propilamina (Da) o con 3,3'-diamino-N-metildipropilamina (Ta). Pueden incorporarse moléculas de tinción en los grupos de ácido γ -amino-butírico, la Ta, o en ambos sitios si ambos están disponibles en la misma molécula.

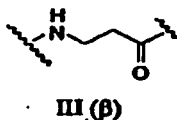
Más recientemente, se ha descubierto que la inclusión de un nuevo aminoácido aromático, 3-hidroxi-N-metilpirrol (Hp), cuando se incorpora en una poliamida y se empareja frente a Py, proporciona el medio para discriminar A-T de T-A. White S. et al., Nature 391, 436-38 (1998). Inesperadamente, la sustitución de un solo átomo de hidrógeno en el pirrol con un grupo hidroxilo en un par Hp/P regula la afinidad y la especificidad de una poliamida en un orden de magnitud. Usar Hp junto con P e Im o I en poliamidas para formar seis pares de aminoácidos aromáticos (I/P, Im/P, P/Im, P/I, Hp/P y P/Hp) proporciona un código para distinguir los cuatro pares base de Watson-Crick en el surco menor del ADN, en entornos en los que el Hp no se descompone.

Las poliamidas presentes de forma natural, como la distamicina y la netropsina, que contienen pirrol, así como sus análogas sintéticas que contienen pirrol/imidazol, se enlazan con gran afinidad al surco menor del ADN. Se ha documentado ampliamente evidencia directa del enlace específico poliamida-ADN por el grupo Dervan usando cristalografía de rayos X, determinación de estructuras por RMN y procedimientos de escisión de afinidad cuantitativa (Baird y Dervan, 1998; Pilch et al., Biochemistry, 38, 2143-51, 1999; Pilch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8306-11 1996; Wang, Ellervik y Dervan, Bioorg. Med. Chem., 9, 653-7, 2001; White, Baird, y Dervan, Biochemistry, 35, 12532-27, 1996; White, Baird y Dervan, Chem. Biol., 4, 569-78, 1997). Debido al esquema de enlaces de H, pueden diseñarse poliamidas sintéticas para reconocer secuencias específicas de ADN.

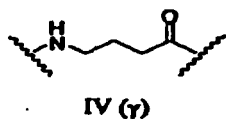
Las reglas para el reconocimiento del ADN mediante poliamidas se resumen en los párrafos siguientes (White, Baird y Dervan, Chem. Biol., 4, 569-78, 1997). El pirrol (típicamente abreviado Py o P) se enlaza a los tres nucleótidos que presentan aceptores de enlaces de hidrógeno en el surco menor, o A, T y C (Kielkopf et al., Science, 282, 111-5, 1998; Kielkopf et al., Nat. Struct. Biol., 5, 104-9, 1998; Melander, Herman y Dervan, Chemistry, 6, 4487-97, 2000). Estos nucleótidos presentan aceptores de hidrógeno únicamente al surco menor: A y C ofrecen cada uno un par solitario de electrones, mientras que T ofrece dos pares solitarios desde el oxígeno del carbonilo enlazado a C2. El NH de la amida de los aminoácidos de pirrol en horquilla es el donante del enlace de hidrógeno. Por ello, el anillo de pirrol actúa como un separador curvado que presenta los NH de amida a la distancia y la curvatura correctas para coincidir con el patrón de los aceptores del enlace de hidrógeno presentados por A, C y T cuando se sitúan en ADN de forma B. Típicamente, el imidazol (Estructura II a continuación) se abrevia I.



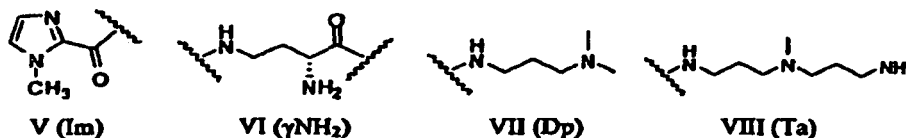
Pueden encontrarse bloques constitutivos de poliamidas y reglas de enlace adicionales en Urbach et al., J. Mol. Biol., 320, 55-71, 2002; Wang, Ellervik y Dervan, Bioorg. Med. Chem., 9, 653-57, 2001. Sin embargo, estos estudios demostraron que la β -alanina (Estructura III (β), a continuación) puede actuar como un donante de un enlace de H que es selectivo para A, T y C.



Para un reconocimiento adicional, se descubrió que el bloque constitutivo de ácido γ -amino butírico (Estructura IV (γ) a continuación) usado para formar la vuelta de la horquilla (véase la Fig. 8) se enlazaba con pares base A/T, pero no G/C. Se muestra una preferencia similar por pares base A/T con respecto a los G/C para la cola cargada positivamente que está presente en la mayoría de las poliamidas. Esto imita al grupo catiónico de guanidina en la distamicina (Parks, Baird y Dervan, 1996; Pilch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8306-11, 1996; Trauger et al., Chem. Biol., 3, 369-77, 1996; Urbach y Dervan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 4343-48, 2001; Urbach et al., J. Mol. Biol., 320, 55-71, 2002; Wang, Ellervik y Dervan, Bioorg. Med. Chem., 9, 653-57, 2001). Las poliamidas de horquilla estándar muestran la mayor afinidad por secuencias que empiezan con 5'-WWG-3', siendo W= A o T.



Otros bloques constitutivos incluyen desamino-imidazol (Fórmula V (Im)), (ácido (R)-2,4-diaminobutírico (Fórmula VI, γNH_2)), 3-(dimetilamino)propilamina (Fórmula VII, Dp) y 3, 3'-diamino-N-metildipropilamina (Fórmula VIII, Ta).



Se ha documentado que el enlace poliamida-ADN interfiere en el enlace proteína-ADN (Fechter y Dervan, J. Am. Chem. Soc., 125, 8476-85, 2003; Nguyen-Hackley et al., Biochemistry, 43, 6880-90, 2004; Schaal et al., Nucl. Acids Res., 31, 1282-91, 2003), y se ha documentado que las poliamidas inhiben la expresión de genes, presumiblemente por competición con factores de transcripción para los sitios de enlace de ADN (Dickinson et al., Biochemistry, 38, 10801-7, 1999; Supekova et al., Chem. Biol., 9, 821-7, 2002; Weisz, 1997). La expresión de genes eucariotas es dependiente de la formación de un complejo activo de transcripción cuyos componentes son sumamente variables y dependientes del promotor/gen. De importancia fundamental en el ensamblaje de un complejo de transcripción es el enlace de factores de transcripción con sus secuencias de consenso asociadas. Aunque muchos genes comparten factores de transcripción (TF), la combinación de un sitio de enlace TF específico con el ADN adyacente único a un gen diana puede proporcionar un sitio relativamente único dentro del genoma humano. Así, diseñando poliamidas para reconocer un sitio de enlace de TF y cierto ADN adyacente, ha sido posible seleccionar la región promotora de un gen único aunque el TF tenga sitios de enlace en las regiones de control de muchos genes.

15 III. Dianas de VPH

La presente invención proporciona poliamidas y análogos de polímeros de poliamidas que son útiles para tratar infecciones de VPH y otras enfermedades. Sin desear estar atados por ninguna teoría particular, la actividad anti VPH de las poliamidas proporciona información para predecir y desarrollar reglas generales para diseñar poliamidas contra todos los subtipos del VPH y contra otros virus de ADN bicatenario. La metodología es útil para predecir qué estructuras de poliamida poseerán una actividad antiviral de amplio espectro contra otros virus de ADN bicatenario, incluyendo los virus de Epstein-Barr, los virus del herpes y los virus de la viruela.

Los experimentos de curso temporal de la acción anti VPH de las poliamidas de esta invención llevaron al descubrimiento de que ciertas moléculas activas disminuyen los niveles de ADN de VPH en queratinocitos humanos en más del 90% tan solo en 30 min después del tratamiento con el fármaco.

25 El ADN de VPH se ancla en cromosomas humanos. Las diversas razones para esto incluyen la necesidad de la proximidad cercana a elementos de replicación del ADN humano para la replicación viral y el mantenimiento nuclear de los episomas y la debida segregación de los episomas virales en células hijas durante la división celular. Además, aunque los procesos son comprendidos de forma deficiente, los genomas virales deben evadir los sistemas inmunitarios innatos que reconocen y eliminan el ADN foráneo o no propio.

30 Sin estar atados por la teoría, es posible que las poliamidas de la presente invención sean capaces ya sea de desplazar el genoma circular del VPH de los cromosomas anfitriones, lo que resulta en su rápida pérdida y degradación del episoma, o de que el enlace de las poliamidas con el ADN viral o nuclear active un proceso que resulte en la eliminación específica de las secuencias virales y no las del ADN anfitrión. Un posible mecanismo para la pérdida del ADN viral puede incluir el desplazamiento del episoma de los cromosomas celulares, llevando, en primer lugar, a la exportación del ADN de VPH del núcleo anfitrión y, en segundo lugar, a la rápida degradación enzimática del ADN de VPH por enzimas nucleasas. Una conclusión adicional es que una razón fundamental para la unión del ADN de VPH a cromosomas anfitriones es proteger el ADN viral de esta red degradativa. Alternativamente, las poliamidas pueden alterar las propiedades físicas del ADN episomático en el núcleo, dando como resultado el reconocimiento y la eliminación del ADN foráneo por mecanismos de defensa del anfitrión. Estas predicciones pueden ser extendidas a otros fármacos que se enlazan con el surco menor del ADN, y también pueden ser extendidas a otros virus de ADN bicatenario, incluyendo los virus de Epstein Barr, que emplean estrategias similares o relacionadas para el mantenimiento episomático.

45 En el caso del VPH, es conocido que la unión con los cromosomas ocurre a través de secuencias largas de las bases A y T del ADN. Estos tramos de AT son dianas para las poliamidas que contienen pirrol, debido al reconocimiento de los pares base AT por el pirrol según se encuentra en el producto natural distamicina, que puede ser considerado un progenitor parcial de la estructura de poliamidas usadas para el enlace con el ADN. La distamicina se enlaza con el ADN rico en AT, pero es una molécula lo bastante pequeña como para que no se

precisen tramos muy largos de AT para atraer a la distamicina: para el reconocimiento por parte de la distamicina bastan regiones de AT de solo cinco bases de longitud.

Las regiones ricas en AT del ADN en lo que se denomina "ADN frágil" son dianas evidentes de la distamicina, y son eliminadas de las células en respuesta al tratamiento con distamicina. Además, en sistemas modelo de reordenamiento y procesamiento del ADN, tal como se encuentran en ciliados y otros microorganismos, precisamente las regiones AT son objeto de blanco para su eliminación durante las reordenaciones genómicas, lo que sugiere que las células pueden retener un mecanismo conservado evolutivamente para el procesamiento y la eliminación del ADN y que las secuencias ricas en AT son blanco probable para el enlace por parte de los pirroles de poliamidas sintéticas o que se presentan de forma natural.

A partir de las invenciones aquí descritas, se pueden desarrollar fármacos útiles contra virus de ADN tal como los subtipos del VPH considerando lo que se denomina índice de selectividad (SI: relación entre CI_{50} y DT_{50}) y la experimentación rutinaria para determinar un intervalo óptimo de índices de selectividad. La propia distamicina es demasiado tóxica para la mayoría de las aplicaciones como un antiviral, o para todas ellas, mientras que las poliamidas largas diseñadas y construidas al efecto por los solicitantes, que seleccionan como objetivo regiones de ADN ricas en AT, tienen una baja toxicidad y un SI muy alto en cultivos celulares. Por ejemplo, el cidofovir dio un SI de 2,5, mientras que el NV1028 dio un SI mayor de 750. En algunas realizaciones, el SI es 500 o más; en otras realizaciones, 200 o más, y en otras el SI es mayor de 100. En algunos casos, las concentraciones requeridas para lograr una DT_{50} pueden superar los límites de solubilidad de los compuestos. En estos casos no será posible el cálculo de un SI exacto.

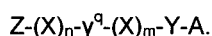
En algunas realizaciones, las secuencias de poliamidas que muestran actividad anti VPH con los tipos del VPH, especialmente VPH 1, 6, 11, 16 y 18, presentan la capacidad de desplazar o eliminar el ADN de VPH de cromosomas anfitriones, lo que da como resultado una amplia aplicabilidad contra los VPH. Estos incluyen el VPH11, que es responsable, en parte, de la enfermedad frecuentemente fatal denominada papilomatosis respiratoria, así como de verrugas genitales, el VPH1 y el 6, que causan las verrugas comunes y verrugas de los genitales externos, el ano y el cuello de útero, respectivamente, y el VPH16 y el 18, que son responsables de los cánceres del cuello de útero.

Las secuencias de ADN de los genomas de VPH16, VPH18, VPH11, VPH6b y VPH1 pueden encontrarse en los número de acceso NC_001526, NC_001357, M14119, NC_001355 y NC_001356, respectivamente, de GenBank.

IV. Poliamidas

A. Estructura general

Los compuestos de la invención comprenden las estructuras activas en la familia de compuestos conocida como derivados de poliamidas en horquilla de N-metilpirrol-N-metilimidazol (Zhang, W., T. Bando y H. Sugiyama (2006) J. Am. Chem. Soc. 128:8766-76). Las estructuras activas son descritas, con las restricciones y las definiciones dadas en lo que sigue, por la fórmula:



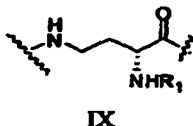
Las estructuras de los bloques constitutivos usados para Z, X, γ^q , Y y A se muestran en las anteriores Fórmulas I-VIII, lo que sirve como un glosario de términos. Véase también, más abajo, la Tabla 1. Los grupos N-metilo de los heterociclos Im-, -Py- y -Im- pueden ser sustituidos por grupos N-etilo y N-trifluorometilo y similares. Los términos de la fórmula se definen como sigue.

Z es el grupo N-terminal protector y puede ser trifluoroacetamida, acetamida, formamida (Lacy et al. (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:2153-63), propionamida, el denominado des-amino-imidazol (denotado Im-, Fórmula V), y similares. Z también puede estar representado por la fórmula Q-C(O)-, en la que Q está seleccionado de H, alifáticos no sustituidos, haloalifáticos, alifáticos C_{1-4} opcionalmente sustituidos con 1 o 2 grupos amina, y un heteroarilo opcionalmente sustituido con alifáticos o haloalifáticos. El heteroarilo puede ser un heteroarilo bicíclico fusionado con un sistema de anillos 6,5 o 5,6.

X comprende bloques constitutivos de poliamidas que incluyen, fundamentalmente los derivados de ácido 4-amino-2-carboxílico de N-metilpirrol (-P- Fórmula I), beta-alanina (β), el derivado de ácido 4-amino-2-carboxílico de N-metilimidazol (-I Fórmula II), y sustitutos para estos grupos, incluyendo aminoácidos alifáticos C_{1-6} distintos de la β -alanina. En una realización, los aminoácidos tienen un patrón de sustitución alfa, omega para los grupos amino y ácido. Otros sustitutos para estos grupos incluyen los alfa-aminoácidos naturales, como la glicina, y los derivados aminoácidos de otros heterociclos (Nguyen et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:7-17; Zhan y Dervan (2000) Bioorg. Med. Chem. 8:2467-2474) o heterociclos fusionados (Briehn et al. (2003) Chemistry-A European Journal 9:2110-2122; Marqués et al. (2004) J. Am. Chem. Soc. 126: 10339-10349; Phillion y Bashkin (2004), Publicación Internacional de PCT N° WO 04/099131; Renneberg y Dervan (2003) J. Am. Chem. Soc. 125:5707-5716, Tsai et al. (2007) Nucl. Acids. Res. 35:307-16; Buchmueller et al., Nucl. Acids. Res. (2005) 33:912-21; Buchmueller et al. (2005) J. Am. Chem. Soc. 127:742-750; Nickols et al. (2007) Nucl. Acids Res. 33:363-70; Zhang et al., J. Am. Chem.

Soc. (2006) 128:8766-76; Floreancig et al., J. Am. Chem. Soc. (2000) 122:6342-50) que han sido diseñados para imitar uno o dos grupos pirrol y/o imidazol. Por ende, X incluye los grupos β -alanina (Fórmula III), 4-amino-2-carbonil-N-metilpirrol (Fórmula I), 4-amino-2-carbonil-N-metilimidazol (Fórmula II), aminoácidos alifáticos C₁₋₆, α -aminoácidos naturales, Fórmula X1, Fórmula X2, Fórmula X3, Fórmula X4, Fórmula X5, Fórmula X6, Fórmula X7 y Fórmula X8 (Tabla 1).

γ° puede ser el bloque constitutivo del ácido gamma-aminobutírico denotado γ (Fórmula IV), el análogo quiral del ácido gamma-aminobutírico denominado ácido (R)-2,4-diaminobutírico (denotado γ -NH₂, Fórmula VI) o su isómero (S), y derivados amídicos de γ -NH₂ derivados de ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico y similares. Por ende, γ° se selecciona de ácido γ -amino butírico (Fórmula IV), ácido (R)-2,4-diaminobutírico (Fórmula VI), ácido (S)-2,4-diaminobutírico, Fórmula γ 1, Fórmula γ 2, Fórmula γ 3, Fórmula γ 4 (Tabla 1) y Fórmula IX,

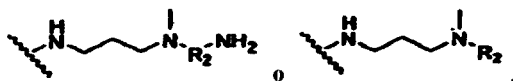


en la que cada R₁ se selecciona independientemente de -C(O)-R_{1A} y cada R_{1A} se selecciona independientemente de H, alifáticos no sustituidos, acilo alifático C₁-C₄ no sustituido, haloalifáticos, un aminoacilo natural catiónico o polarmente neutro derivado de aminoácidos y un polietilenglicol C₂-C₂₀.

Y comprende -P- (Fórmula I), -I- (Fórmula II), beta-alanina (Fórmula III), otros aminoácidos alifáticos C₁₋₆ y similares, en los que los amino y los ácidos pueden ser incorporados en un patrón de sustitución alfa, omega, y aminoácidos naturales, incluyendo la glicina. Y también incluye la Fórmula X7 (Tabla 1), aminoácidos alifáticos C₁₋₆, y α -aminoácidos naturales.

A comprende un grupo polar que es catiónico y está tomado de la familia ejemplificada por 3-dimetilamino-propilamina (Dp, Fórmula VII), bis(aminopropilamina) (Ta, Fórmula VIII) y aminas oligoaminas y poliaminas alifáticas lineales y cíclicas relacionadas. "A" también puede escogerse de amidinas, guanidinas, sales secundarias de amonio, sales de sulfonio, sales de fosfonio y otros grupos catiónicos C-terminal encontrados en poliamidas que se enlazan con el ADN y en los productos naturales relacionados distamicina A, netropsina y similares.

Por ello, A puede incluir la Fórmula A1, la Fórmula A2, la Fórmula A3, la Fórmula A4, la Fórmula A5, la Fórmula A6, la Fórmula A7, la Fórmula A8, la Fórmula A9, la Fórmula A10, la Fórmula A11 (Tabla 1) y



en la que cada R₂ es, independientemente, alifático C₁₋₅.

La fórmula Z-(X)_n- γ° -(X)_m-Y-A describe moléculas activas con las siguientes condiciones:

Que $m + 3$ sea ≥ 10 o 11.

Que $n = m$ o $m - 1$ o $m - 2$.

Que los bloques constitutivos derivados del imidazol o sus análogos se incorporen solo como aproximadamente el 0-10% de la suma de bloques constitutivos $2 + n + m$; el número "2" da cuenta de la presencia de Z y γ° como bloques constitutivos. Así, para una molécula activa, con $2 + n + m = 22$, hay presentes típicamente aproximadamente de 0 a 2 grupos imidazol, incluyendo su posible uso como grupo Z. m puede ser hasta 25, de modo que el número total de bloques constitutivos puede ser 50, 40, 30, 20, 15 o 10.

Que haya una beta-alanina, de modo que el grupo más largo de bloques constitutivos heterocíclicos contiguos sea aproximadamente 4, que la beta-alanina ocurra después de dos, tres o cuatro P contiguos y/o bloques constitutivos I, como se ejemplifica con -P-P-P-P- β y I-P-P- β . En una realización, la beta-alanina ocurre después de cada tres o cuatro heterociclos contiguos.

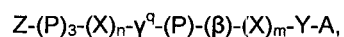
Que ciertos heterociclos fusionados u otros heterociclos puedan usarse con moderación para sustituir los bloques constitutivos -P-, Im- o -I- de Z y X, tal como se ha descrito previamente para poliamidas que se enlazan con el ADN que comprenden fundamentalmente grupos -P-, Im- e -I- (Briehn et al. (2003) Chemistry-A European Journal 9:2110-2122; Buchmueller et al. (2006) Abstracts of Papers, 231st ACS National Meeting, Atlanta, GA, EE. UU., 26-30 de marzo de 2006: ORGN-678; Dervan et al., Publicación Internacional de PCT N° WO04/078943; Nguyen et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:7-17; Phillion y Bashkin, Publicación Internacional de PCT N° WO 04/099131; Renneberg y Dervan (2003) J. Am. Chem. Soc. 125: 5707-5716; Turlington et al. (2006) Heterocyclic Communications 12:89-92; Uthe et al (2005)

Heterocyclic Communications 11:163-166; Zhan y Dervan (2000) Bioorg. Med. Chem. 8:2467-2474). En tales casos, habrá aminoácidos alifáticos, incluyendo los aminoácidos alfa, omega beta-alanina o γ^q y similares, después de 2 - 4 (o después de 3 o 4) sustituciones contiguas para los bloques constitutivos -P-, -Im- o I-.

- 5 Así, el número total de unidades de 4-amino-2-carbonil-N-metilimidazol (Fórmula U) en $Z-(X)_n-\gamma^q-(X)_m-Y-A$ es menor que $0,10(m+n+2)$.

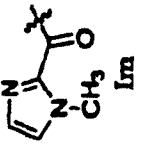
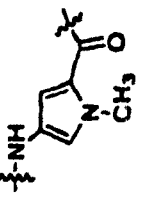
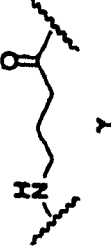
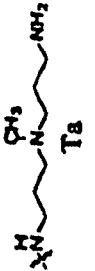
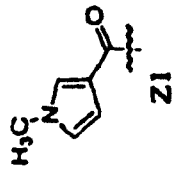
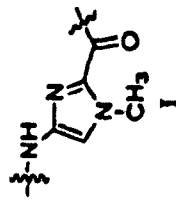
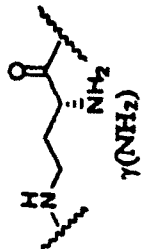
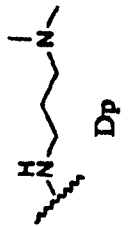
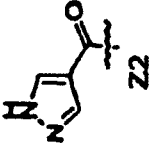
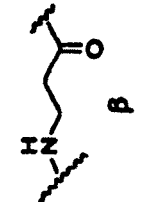
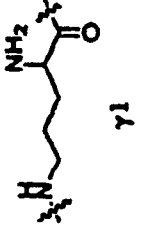
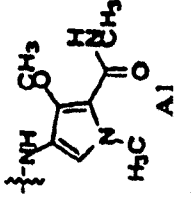
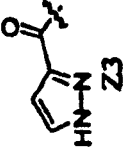
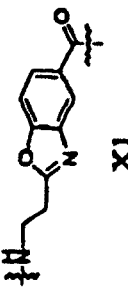
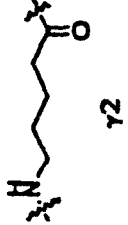

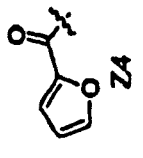
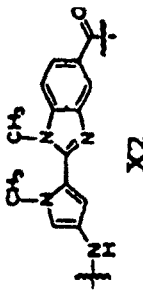
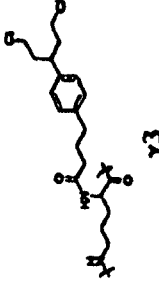

- 10 Cualquier unidad de β -alanina (Fórmula III) en $Z-(X)_n-\gamma^q-(X)_m-Y-A$ es adyacente a al menos tres unidades contiguas de 4-amino-2-carbonil-N-metilpirrol (Fórmula I), al menos tres unidades contiguas de 4-amino-2-carbonil-N-metilimidazol (Fórmula II), o al menos tres unidades contiguas de cualquier combinación de 4-amino-2-carbonil-N-metilpirrol (Fórmula I) y 4-amino-2-carbonil-N-metilimidazol (Fórmula II).

El compuesto tiene la fórmula

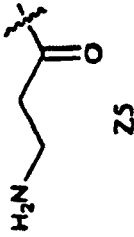
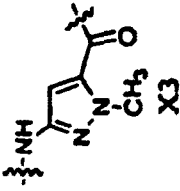
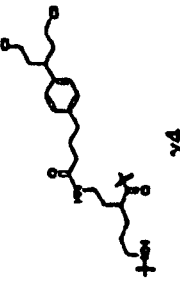
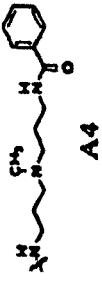

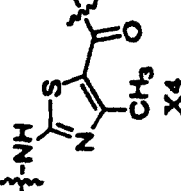

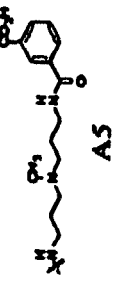
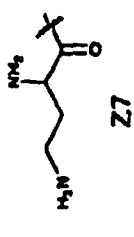
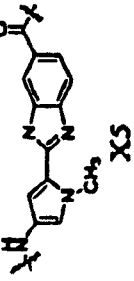
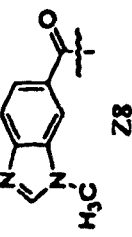
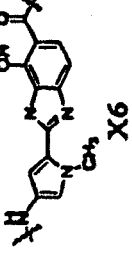
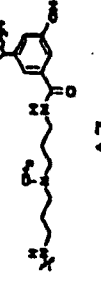
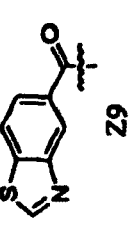
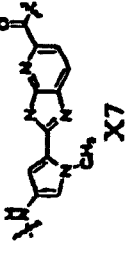

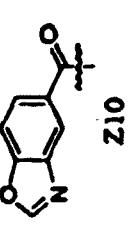





o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo $m + 3$ al menos 9; y los otros sustituyentes son según se ha descrito en lo que antecede.

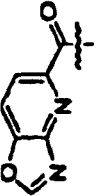
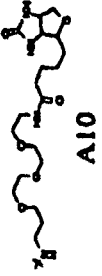
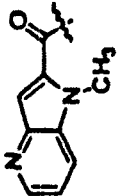
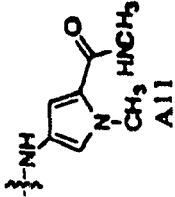
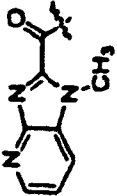
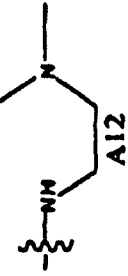
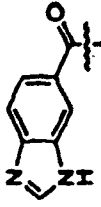

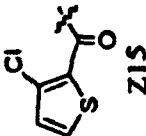

Tabla 1. Bloques constitutivos de poliámidas

Z	X	Y	A
 <p>Im CH₃</p>	 <p>Pv o P CH₃</p>	 <p>Y</p>	 <p>TB CH₃ NH₂</p>
 <p>H₃C</p> <p>Z1</p>	 <p>I CH₃</p>	 <p>Y(NH₂)</p>	 <p>Dp</p>
 <p>Z2</p>	 <p>β</p>	 <p>Y1 NH₂</p>	 <p>Al H₃C NH₂ O CH₃</p>
 <p>Z3</p>	 <p>X1</p>	 <p>Y2</p>	 <p>A2</p>
 <p>Z4</p>	 <p>X2 CH₃ CH₃</p>	 <p>Y3</p>	 <p>A3</p>

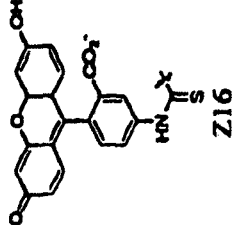

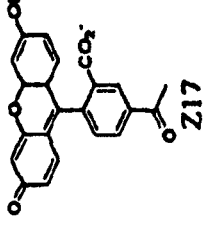
(continuación)

z	x	γ	A
 <p>Z5</p>	 <p>X3</p>	 <p>γ4</p>	 <p>A4</p>
 <p>Z6</p>	 <p>X4</p>	 <p>γ5</p>	 <p>A5</p>
 <p>Z7</p>	 <p>X5</p>	<p>ácido (R) y (S) 2-hidroxi-γ-aminobutírico</p>	
 <p>Z8</p>	 <p>X6</p>		 <p>A6</p>
 <p>Z9</p>	 <p>X7</p>		 <p>A7</p>
 <p>Z10</p>	 <p>X8</p>		 <p>A8</p>
			 <p>A9</p>

(continuación)

z	x	γ^A	A
 <p>Z11</p>	(S)-isoserina		 <p>A10</p>
 <p>Z12</p>	ácido γ -aminobutírico		 <p>A11</p>
 <p>Z13</p>			 <p>A12</p>
 <p>Z14</p>			 <p>espermidina (a)</p>
 <p>Z15</p>			 <p>espermidina (b)</p>

(continuación)

<p>z</p>  <p>Z16</p>	<p>x</p>	<p>y^a</p>	<p>A</p>  <p>Espermina</p>
 <p>Z17</p>			<p>Di o poliaminas alifáticas de la fórmula $NH_2[CH_2(NH_2)]_d$, siendo d = 2-6 y e = 2-6</p>

Los componentes Z, X, Y A pueden incluir estructuras bicíclicas heteroaromáticas fusionadas (o sea, en las que uno de los anillos de las mismas es heteroaromático y el otro es aromático o heteroaromático). Estas son descritas en las Publicaciones Internacionales de PCT WO 04/099131 y WO 05/033282. Esta estructura puede actuar como un
 5 aceptor de enlaces de hidrógeno para enlazarse con la guanina en el surco menor del ADN bicatenario, y la estructura no puede formar un tautómero en el que el heteroátomo se convierta en un donante de enlaces H. Los compuestos bicíclicos pueden contener restos de enlace, como una amida o restos de enlace que contienen amidas. En consecuencia, el compuesto puede comprender una serie de, al menos, aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 o más restos cíclicos (por ejemplo, heterocíclicas, incluyendo restos heteroaromáticos y estructuras bicíclicas fusionadas,
 10 tal como se describe en el presente documento) que están enlazadas con uno o más restos de enlace para formar un emparejamiento complementario con nucleótidos del ADNbc.

La estructura bicíclica fusionada está directamente enlazada con otra estructura bicíclica fusionada o con un resto heterocíclico (por ejemplo, un anillo de pirrol o imidazol). En consecuencia, la adición de cada estructura bicíclica fusionada en la poliamida permite la eliminación de un donante de enlaces H (por ejemplo, un conector amido o un
 15 resto que contiene amido). Así, las poliamidas son susceptibles de interacciones alteradas o mejoradas en el surco menor del ADN.

Las poliamidas de la invención incluyen los compuestos $ImPP\beta PIP\beta PP\gamma(NH_2)PP\beta PPP\beta PPP\beta Ta$, $ImPP\beta PPP\gamma(NH_2)PP\beta PPP\beta Ta$, $ImPPP\beta PP\gamma PPP\beta PPP\beta P\beta Ta$, $ImPP\beta PPP\gamma PPP\beta PPP\beta Ta$, $ImPPP\beta PPP\beta \gamma(NH_2)PP\beta PPP\beta P\beta Dp$, en los que Im es N-metil-imidazol (Fórmula V), P es metilpirrol (Fórmula I), Dp es dimetilaminopropilamida (Fórmula VII), β
 20 es β -alanina (Fórmula III), I es derivado -amino-2-carboxílico de N-metilpirrol (Fórmula II) y Ta es bis(aminopropilamina) (Fórmula VIII).

En la Figura 6 se muestra en la estructura química de una poliamida representativa de la invención.

Los análogos que carecen de una β -alanina en la posición C-terminal y los análogos que tienen una vuelta diamino y acetilada pueden mejorar la captación celular y la localización nuclear (Best et al, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
 25 100:12063-68; Crowley et al (2003), Publicación Internacional de PCT N° WO 03/041128; Crowley et al (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett. 13:1565-70; Edelson et al. (2004) Nucl Acids Res. 32:2802-18).

Las poliamidas pueden ser modificadas por uno o más de los procedimientos siguientes: (1) eliminar la beta-alanina que enlaza la poliamida a la cola diamina catiónica Dp; (2) usar colas catiónicas triamina (Ta) para acceder a redes activas de captación de espermidina; y (3) disminuir el punto isoeléctrico de las poliamidas (pI) para disminuir su
 30 acumulación en vesículas acidulantes. En algunas realizaciones, las poliamidas están alteradas con todas las modificaciones 1, 2 y 3.

Las poliamidas pueden contener, en el extremo C-terminal, FITC (isotiocianato de fluoresceína), BIODIPY u otro compuesto que pueda ser usado para determinar la localización celular. Las poliamidas que contienen FITC en el extremo C-terminal con captadas más fácilmente por las células.

Además de formar estructuras en horquilla, las poliamidas pueden formar dímero, algunos de los cuales están conectados, tal como se muestra en la Figura 8. Así, pueden formarse análogos de horquillas activas usando estos motivos alternativos de poliamidas descritos por Dervan. Véase, por ejemplo, Dervan y Edelson (2003) Curr. Opin. Struct. Biol 13:284-99.

Las poliamidas seleccionan como dianas a VPH18, VPH16, VPH11, VPH6 o VPH1.

Las poliamidas seleccionan como dianas a virus de ADN, que incluyen el virus de Epstein-Barr, el virus del herpes, los virus de la viruela y otros virus bicatenarios. Posibles dianas dentro de estos virus pueden incluir secuencias requeridas para el mantenimiento de la unión o la replicación.

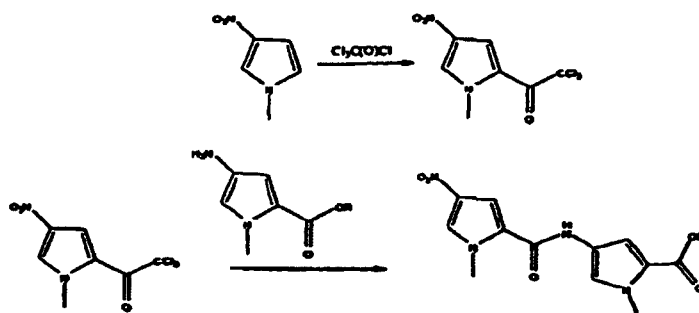
B. Esquemas generales de síntesis

Tal como se describe en el presente documento, las poliamidas pueden estar disponibles comercialmente o ser producidas mediante procedimientos conocidos a partir de materiales de inicio conocidos. Véanse, por ejemplo, WO 05/033282, Belitsky et al., (2002) Bioorg. Med. Chem., 10, 2767-74; Zhang et al. (2006) J- Am. Chem. Soc. 128:8766-76; Turner et al. (2001), Organic Letters, 3:1201-03.

Las poliamidas pueden prepararse usando síntesis manual de fase sólida, así como química automatizada de fase sólida. Cada acoplamiento va seguido por HPLC y HPLC/espectrometría de masa (o por espectrometría de masa MALDI cuando el PM supera 1500).

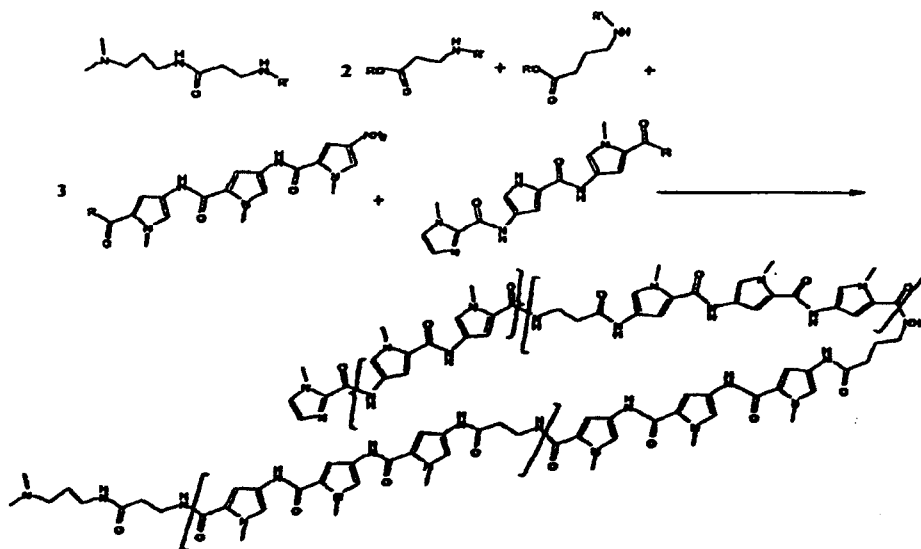
En la síntesis de poliamidas en fase de solución, pueden usarse dos rutas principales de formación de enlaces amida: (1) la reacción de haloformo y (2) reacciones de aminas ácidos en presencia de agentes de acoplamiento como DCC, EDC o HATU (cuando se requiera). Para los bloques heterocíclicos constitutivos de los solicitantes, la reacción del haloformo puede ser el procedimiento descrito en Xiao et al., (2000) Chin. J. Chem, 18:603-07 y Xiao et

al., (2000) J. Org. Chem., 65:5506-13, porque la tricloroacetona relevante puede ser creada directamente de tricloroacetilcloruro y el heterociclo (Esquema 1).



Esquema I: Reacción del haloformo: preparación de material de inicio y su uso en la formación de dímeros

5 Las etapas del Esquema I irían seguidas por la reducción del grupo nitro con H_2 y Pd/C. El grupo amino libre resultante puede ser protegido o acoplado inmediatamente a un bloque constitutivo adicional. El uso de procedimiento de disolución para crear una poliamida completa se ilustra en el Esquema II. Pueden identificarse bloques constitutivos comunes para una poliamida, permitiendo una síntesis eficaz en fase de solución: el dímero P-P puede ser creado y purificado a gran escala y ser usado luego directamente o elaborado posteriormente, como en el Esquema II, para formar las secciones principales de la secuencia diana, y luego el producto final.



Esquema II

10 El Esquema II muestra una estrategia de aumento de escala basada en un ensamblaje en fase de solución de una poliamida activa a partir de bloques constitutivos de trímeros y monómeros. La unidad P-P común puede ser elaborada para formar una molécula completa. Se muestran los pirroles adicionales. Se muestran las β-alaninas adicionales, y se ve que el fragmento N-β-alanina-Py-Py-Py ocurre dos veces en la molécula (indicado por corchetes cuadrados). También se muestran tres fragmentos finales únicos. Véase, por ejemplo, Xiao et al., J. Org. Chem (2000) 65:5506-13.

15 En la publicación de patente estadounidense nº US 2004/0171799 se describe otro procedimiento para producir una poliamida de pirrol-imidazol.

Otro procedimiento adicional de síntesis es preparar un oligómero de poliamida a partir de una resina de síntesis de fase sólida de Boc-β-alanina-WANG o de una resina similar disponible comercialmente, añadiendo bloques constitutivos según se requiera para la secuencia diana (Véase el Ejemplo 8).

20 La estructura de los compuestos de poliamidas fue caracterizada con espectrometría de masa MALDI después de añadir cada unidad y después de la etapa final de síntesis. Las mediciones se llevaron a cabo en Peptides International (Louisville, Kentucky). Las poliamidas pueden ser purificadas hasta una pureza del 98% o mayor mediante HPLC preparativa (requiriéndose a veces una segunda HPLC nm preparativa). Las fracciones combinadas

de HPLC del producto final tras HPLC analítica y espectros de masa (MALDI) mostraron la presencia del producto final y la ausencia de secuencias fallidas.

V. Composición farmacéutica

A. Formulación

- 5 En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables, comprendiendo estas composiciones cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento y comprendiendo opcionalmente un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden además, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 10 Las poliamidas pueden estar en forma de sales de trifluoroacetato (TFA), así como sales de cloruro, succinato, ascorbato y similares. También pueden ser formuladas con excipientes tales como PEG-400, propilenglicol y similares.

15 Para aumentar la estabilidad, se colocará el fármaco de poliamida en una solución acuosa con un antioxidante tal como ácido ascórbico, BHT y BHA para desarrollar una fórmula más estable (véanse Mayers CL et al (1993) Pharma Res, 10: 445-448, y Stuhar M, (1984) Farmaceuticky Obzor, 53; 499-504).

20 Para la administración a la vagina y el cuello de útero, las poliamidas se formularán en soluciones, emulsiones, suspensiones, comprimidos, geles, espumas, supositorios, películas, esponjas y anillos vaginales. Las formulaciones incluyen geles (por ejemplo, hidroxietilcelulosa y ácidos poliacrílicos, por ejemplo carbopoles), y películas de alcohol polivinílico que pueden ser administradas por medio de un aplicador al sitio diana. Alternativamente, pueden administrarse formulaciones líquidas de menor viscosidad (por ejemplo, soluciones de PEG) en una esponja de poliuretano a la zona alrededor del cuello de útero (Okada, (1991) en "Peptide and Protein Drug Delivery" VH. Lee, ed., pp. 663-666. Marcel Dekker, Nueva York; Garg et al. (2001), Pharm. Tech. 25:14-24). Debido a la carga de las poliamidas, las poliamidas pueden ser formuladas en un vehículo de administración controlada usando carbopoles. Si la poliamida tiene una carga de +1 o +2, ajustando la intensidad iónica de la formulación puede enlazarse electrostáticamente la poliamida al carbopol y, por ello, la velocidad de liberación. En todas las formas de dosificación semisólida que producen PA química y físicamente estables, evaluaremos la velocidad de liberación en un aparato de membrana como se describe en la farmacopea estadounidense (Dipiano et al., Publicación Internacional de PCT N° WO 04/064913) para la difusión de fármacos a partir de formas de dosificación semisólida. Las poliamidas formuladas en geles a base de carbopoles presentan esfuerzos significativos a la fluencia, y también tienen propiedades bioadhesivas potenciales (Kieweg et al. (2004) J. Pharm Sci. 93, 2941-52).

35 Las fórmulas de la Tabla 2 fueron escogidas para evaluar una gama de excipientes usados para formulaciones vaginales comerciales (Garg et al., 2001). También pueden añadirse varios excipientes comúnmente usados, tales como PEG (polietilenglicol), PVA (alcohol polivinílico) y tensioactivos Tween. Además de antioxidantes, pueden usarse compatibilizantes o estabilizantes. Las formas sólidas puede permitir fórmulas más estables, con tiempos de almacenamiento más prolongados debido a su estado físico. Pueden resultar útiles las emulsiones fabricadas a partir de bioadhesivos usando polímeros tales como el carbopol. También pueden usarse la HPMC (hidropropilmetil celulosa), el PVA (alcohol polivinílico) y complejos lípidos para fármacos de menor solubilidad. Los sistemas lipídicos pueden ser entonces suspendidos en un gel viscoelástico para la administración de la poliamida insoluble.

40 Tabla 2. Fórmulas de primera generación para la administración de poliamidas a cultivos en balsa y al cuello de útero de conejo

Fórmula prototipo	Excipientes + API	(concentración) u otra(s) variable(s)	Dispositivo final de administración
solución	Poliamida, DMSO, agua, BHT	(Poliamida)	Jeringa vaginal, esponja de poliuretano, aplicador de algodón
solución	Poliamida, DMSO, PEG	[Poliamida] y PM de PEG	Jeringa vaginal, esponja de poliuretano, aplicador de algodón
bioadhesivo	Poliamida en policarbofilo	[Poliamida]	Aplicador de administración sólida o en emulsión
película	Poliamida en PEG 400 y ésteres de ácidos grasos de PEG, tween 80 y un mínimo de DMSO	[Poliamida], [PEG 400] y [ésteres de ácidos grasos de PEG]	Jeringa vaginal
película	Poliamida, un mínimo de DMSO, alcohol polivinílico	[Poliamida]	Inserto sólido
gel	Poliamida, carbopol 974; poliamida y carbómero 9434P y policarbofilo	[Poliamida]	Aplicador de gel

Fórmula prototipo	Excipientes + API	(concentración) u otra(s) variable(s)	Dispositivo final de administración
comprimido	Poliamida y dióxido de sílica coloidal	(Poliamida)	Aplicador de gel o inserto sólido
comprimido	Almidón de maíz, lactosa, estearato de magnesio, 1-vinil-2 pirrolidona	(Poliamida)	Inserto
liposoma	Poliamida, fosfatidilcolina, aditivos como tween 80, colatos de DMSO	Composición	Aplicador de jeringa

Para una administración más sostenida o efectiva, pueden usarse dispositivos de barrera cervical disponibles, tales como diafragmas, que pueden administrar el fármaco al sitio del cuello de útero durante muchas horas. Para una administración aún más continua, pueden emplearse anillos vaginales o películas poliméricas implantables de liberación lenta. Además, pueden usarse varios nuevos sistemas de administración vaginal en fase de ensayo clínico, tales como la tecnología de esponja vaginal y el diafragma SILCS, un dispositivo de sílica de talla única que puede administrar el fármaco tanto al cuello del útero como a la pared vaginal (Cohen, (2004), *The Microbicide Quarterly*, 2:15-19). Para una administración continua del fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, hay disponibles anillos vaginales con liberación lenta del fármaco a partir del compuesto del anillo (Cohen, 2004; Hussain y Ahsan, (2005), *J. Controlled Release* 103:301-13). Hay también numerosos aplicadores y fórmulas adicionales que han sido desarrollados para la administración controlada del fármaco por vía vaginal (Robinson (1999) *Proc. Of the 26th Intl. Symp. Controlled Release of Bioactive Materials*. 26:2-3; Hussain y Ahsan, 2005).

Las formulaciones para la administración transdérmica incluyen fórmulas a base de lípidos para la administración de productos farmacéuticos proteínicos a las verrugas genitales (Foldvari et al., (1999), *Biotech. Appl. Biochem.* 30:129-37; Leigh (2003), *Drugs and the Pharm. Sci.*, 126: 791-800; Lee et al., (2004) *Biomaterials*, 26:205-10), formulaciones bioadhesivas (Bogataj y Mrhar (1998) *Bioadhesive mucosal drug delivery systems*, 49:445-57; Amaral et al. (1999) *Contraception*, 60:361-66; Barry, (1987) en "Drug Delivery systems", Johnson y Lloyd-Jones, eds., cap. 11, Ellis Horwood, Chichester; Vermani et al. (2002) *Drug Dev. Indust. Pharm.* 28:1133-46) y sistemas poliméricos novedosos. Los polímeros novedosos incluyen anillos intravaginales antivirales biodegradables parcialmente absorbibles (Shalaby (2005), publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2005/053639), películas poliméricas bioadhesivas bilaminares aplicadas directamente al cuello del útero (Sidhu et al., (1997) *Br. J. Obstetrics and Gynaecology*, 104:145-49), discos poliméricos novedosos de acción lenta en la mucosa cervical y sistemas termogelantes que tienen la ventaja de una bioadherencia potencialmente mucho mayor y de la retención de la forma de dosis (Saltzman y Radomsky (1990), *Polymer Preprints*, 31:245-46; Edelman y Mark (1998), *Nature Biotech.* 16:136-37). También pueden formularse poliamidas usando péptidos que penetren la membrana celular (Gupta et al. (2005), *Adv. Drug Del. Rev.* 57:637-51; Wadia y Dowdy (2005), *Adv. Drug Del. Rev.*, 57:579-96).

Las poliamidas también pueden ser formuladas con un polímero farmacéuticamente aceptable diseñado para alargar el tiempo antes de la eliminación renal.

Las poliamidas también pueden ser formuladas para administrar un tratamiento en aerosol de los pulmones.

Se apreciará también que ciertos compuestos pueden existir en forma libre para el tratamiento o, cuando sea apropiado, como un derivado farmacéuticamente aceptable o un profármaco de los mismos. Un derivado farmacéuticamente aceptable o un profármaco incluyen, sin limitación, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, sales de tales ésteres o cualquier otro aducto o derivado que, tras su administración a un paciente necesitado, sea capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto como se describa por lo demás en el presente documento, o un metabolito o un residuo del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales, dentro del ámbito del juicio médico fundado, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son acordes con una relación razonable beneficio/riesgo. Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal no tóxica o sal de un éster de un compuesto de esta invención que, tras su administración a un receptor, sea capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto de esta invención o un metabolito o residuo del mismo inhibitoriamente activo.

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge et al. describen con detalle sales farmacéuticamente aceptables en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido perclórico, o con ácidos orgánicos tales como el ácido acético, incluyendo el ácido trifluoroacético, el ácido oxálico, el ácido maleico, el ácido tartárico el ácido cítrico, el ácido succínico o el ácido malónico, o usando otros procedimientos usados en la técnica, tal como el intercambio de iones. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato,

5 etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Sales derivadas de bases apropiadas incluyen las sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos, de amonio y N⁺(alquilo C₁₋₄)₄. Pueden obtenerse productos solubles o dispersables en agua o aceite mediante cuaternización. Sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen las de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sean apropiadas, las no tóxicas de amonio, de amonio cuaternario y los cationes amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.

15 Tal como se ha descrito en lo que antecede, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden, además, un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, lo cual, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier disolvente, diluyente u otro vehículo líquido y todos ellos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sean adecuados para la forma de dosificación particular deseada. El libro Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1980) da a conocer diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Salvo en la medida en la que cualquier medio portador convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, como que produzca cualquier efecto biológico no deseable o interactúe de otra forma de manera nociva con cualesquiera otros componentes de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su uso está dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, 20 lecitina, proteínas de suero, tal como la albúmina de suero humano, sustancias tampón como fosfatos, glicina, ácido sórbico, o sorbato potásico, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos saturados de origen vegetal, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, pirrolidona de polivinilo, poliácridatos, ceras, copolímeros de bloques polietileno-polioxipropileno, grasa de lana, azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tal como la carboximetilcelulosa de sodio, la etilcelulosa y el acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites como el aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de ajonjolí; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como un propilenglicol o un polietilenglicol; ésteres tales como el oleato de etilo y el laurato de etilo; agar; agentes tampón como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; suero fisiológico isotónico; solución de Ringer; también pueden estar presentes en la composición, según el juicio del formulador, alcohol etílico y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como el laurilsulfato de sodio y el estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes desmoldeadores, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, 35 saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

40 Según la invención, una "cantidad efectiva" del compuesto o de la composición farmacéuticamente aceptable es aquella cantidad efectiva para tratar o aminorar la gravedad de las infecciones de VPH.

B. Administración

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración efectiva para tratar o aminorar la gravedad de una enfermedad crónica de VPH.

45 La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad, el sexo, la altura, la dieta, la condición médica y la condición general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración y similares. Otros factores que afectan el régimen de dosificación incluyen consideraciones farmacológicas tales como la actividad, la eficacia, la farmacocinética y los perfiles de toxicología de los compuestos empleados, de si se usa un sistema de administración del fármaco y de si los compuestos son administrados con otros ingredientes. La dosificación puede ser determinada de forma rutinaria usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por lo tanto, el régimen de dosificación empleado realmente puede variar ampliamente con base en el sujeto tratado y, por ello, desviarse del régimen ejemplar de dosificación expuesto en lo que sigue. Los compuestos de la invención se formulan preferentemente en forma de unidades de dosificación para la facilidad de administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación", tal como se usa 55 en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente diferenciada de un agente apropiado para el paciente que va a ser tratado. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico responsable dentro del ámbito del juicio médico fundado. El nivel específico de dosis efectiva para cualquier paciente u organismo particulares dependerá de varios factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y de la gravedad del trastorno; de la actividad del compuesto específico empleado; de la composición específica empleada; de la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; de la hora de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico

empleado; de la duración del tratamiento; de los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares conocido en las técnicas médicas. El término "paciente", tal como se usa en el presente documento, significa un animal; por ejemplo, un mamífero o un ser humano.

5 La administración de los compuestos puede ser con un régimen que demande una sola dosis diaria, múltiples dosis separadas a lo largo del día, una sola dosis cada dos días, una sola dosis cada varios días u otros regímenes apropiados.

10 Por ejemplo, las poliamidas formuladas pueden ser administradas una vez al día con una concentración final de 5 mg/mL (concentración aproximada de 2.5 mM) en aproximadamente 4 ml de vehículo mediante un aplicador vaginal, por ejemplo, al fórnix posterior de la vagina. Si se administra por la tarde antes de acostarse, se prevé que la mayor parte del fármaco permanecerá en los aspectos más altos del canal vaginal, en estrecha proximidad con el cuello de útero, debido a la falta de deambulación. En una realización, se administrará la formulación de poliamida durante 10 días.

15 Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden ser administradas a seres humanos y a otros animales de forma oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como en polvos, pomadas o gotas), bucal como en nebulización oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se esté tratando. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden ser administrados oral o parenteralmente con niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y, preferentemente, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

20 Las formas de dosificación líquida para la administración oral incluyen, sin limitación, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencilico, benzoato bencilico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, 25 dimetilformamida, aceites (en particular, los aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, aceite de germen de trigo, de oliva, de ricino y de ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionante y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes.

30 Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, una suspensión o una emulsión inyectables estériles en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, como, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden encontrarse están el agua, la 35 solución de Ringer, y la solución de cloruro de sodio de la U.S.P. e isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites estériles no volátiles como medio disolvente o de suspensión. Con este fin puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos como el ácido oleico.

40 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

45 Para prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, es a menudo deseable ralentizar la absorción del compuesto a partir de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con hidrosolubilidad deficiente. La velocidad de absorción del compuesto depende, entonces, de su grado de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. De forma alternativa, la absorción retardada de una forma de compuesto administrada parenteralmente se consigue disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectable se crean formando matrices de microencapsulación del compuesto en polímeros biodegradables, tales como polilacturo-poliglicólido. Dependiendo de la proporción entre compuesto y polímero y de 50 la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del compuesto. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli (anhidridos). También se preparan formulaciones inyectables de depósito atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

55 Las composiciones para la administración rectal o vaginal pueden ser supositorios, que pueden prepararse mezclado los compuestos de esta invención con excipientes o portadores no irritantes adecuados, como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios, que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y que, por lo tanto, se derriten en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el componente activo.

Las formas de dosificación sólida para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o (a) materiales de carga o expansores como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido salicílico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y acacia, (c) humectantes como el glicerol, (d) agentes desintegrantes como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, (e) agentes retardantes de la disolución, como la parafina, (f) aceleradores de la absorción, como los compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes como el caolín y la arcilla de bentonita, y (i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tampón.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como materiales de carga en cápsulas de gelatina duras y blandas rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares. Las formas de dosificación sólida en comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el o los ingredientes activos única o preferentemente en cierta parte del tracto intestinal de manera opcionalmente retardada. Ejemplos de composiciones integradas que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden usarse composiciones sólidas de tipo similar como materiales de carga en cápsulas de gelatina duras y blandas rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes, según se ha hecho notar en lo que antecede. Las formas de dosificación sólida en comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como la sacarosa, la lactosa o el almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es la práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes; por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros adyuvantes para la formación de comprimidos, como el estearato de magnesio y la celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tampón. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el o los ingredientes activos única o preferentemente en cierta parte del tracto intestinal de manera opcionalmente retardada. Ejemplos de composiciones integradas que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, nebulizaciones, inhalantes o parches. Se mezcla el componente activo en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante o tampón necesario según pueda requerirse. También se contempla que estén dentro del alcance de esta invención formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos y gotas para los ojos. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se preparan disolviendo o dispersando el compuesto en el medio debido. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa puede ser controlada ya sea proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando el compuesto en una matriz o un gel poliméricos.

Tal como se ha descrito en general en lo que antecede, los compuestos de la invención son útiles como tratamientos para enfermedades causadas por el VPH, incluyendo las enfermedades crónicas causadas por el VPH.

Más de un componente de la invención puede ser administrado por separado, simultáneamente o secuencialmente a células infectadas, a tejido que contiene las células infectadas y a organismos infectados, incluyendo mamíferos y pacientes.

Se apreciará también que los compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser empleados en terapias de combinación; es decir, los compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden ser administrados de forma concurrente, con anterioridad o con posterioridad a uno o más procedimientos médicos o terapéuticos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticas o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de las terapéuticas y/o de los procedimientos deseados y el efecto terapéutico que desea lograrse. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, puede administrarse un compuesto de la invención de forma concurrente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden lograr efectos diferentes (por ejemplo, el control de cualquier efecto adverso). Tal como se usan en el presente

documento, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad o afección particular se denominan "apropiados para la enfermedad o la afección que se está tratando".

5 La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será mayor que la cantidad que se administraría normalmente en una composición que comprendiera ese agente terapéutico como único agente activo. Preferentemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones dadas a conocer en el presente documento oscilará entre aproximadamente el 50% y el 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como único agente terapéuticamente activo.

10 Los compuestos de esta información o las composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos también pueden incorporarse en las composiciones de recubrimiento de un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, stents y catéteres. Los recubrimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables recubiertos se describen en las patentes estadounidenses n^{os} 6.099.562, 5.886.026 y 5.304.121. Típicamente, los recubrimientos son materiales poliméricos biocompatibles, tales como polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, acetato de vinilo y etileno y mezclas de los mismos. Opcionalmente, los recubrimientos pueden estar cubiertos adicionalmente por un recubrimiento final de fluoresceína, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para impartir características de liberación controlada a la composición.

VI. Procedimientos de tratamiento

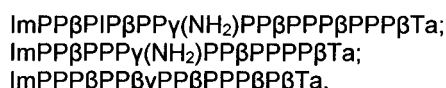
20 Otro aspecto de la invención versa sobre compuestos para tratar células afectadas por el VPH o virus del papiloma o por otros virus de papiloma en una muestra biológica o un paciente (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*) administrando a un paciente (un ser humano u otro animal), o poniendo en contacto dicha muestra biológica con una composición farmacéutica que comprende una poliamida según se describe en el presente documento. La expresión "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia, o extractos del mismo, obtenido de un mamífero; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos. El término "paciente" incluye animales, incluyendo mamíferos, seres humanos, primates, perros, gatos, caballos, cerdos, vacas, ovejas y similares.

25 Una vez que las células de un individuo se exponen y se infectan con VPH, pueden establecerse varias copias de episomas de VPH dentro de una célula infectada. Los episomas de VPH se replican adicionalmente a medida que las células se dividen, formando aproximadamente el mismo número de copias episomáticas de VPH en cada nueva célula (por ejemplo, tras la división celular, una célula que contenga 20-100 copias formará dos nuevas células, conteniendo cada una de ellas aproximadamente 20-100 copias de episomas. Las poliamidas diseñadas para seleccionar como dianas regiones ricas en A/T pueden promover la eliminación de los episomas del VPH. De aquí que los compuestos de la presente invención también puedan usarse beneficiosamente en un procedimiento terapéutico para tratar el VPH.

30 En una realización, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* de tratamiento de células afectadas por el VPH que comprende poner en contacto a las células con un compuesto descrito en el presente documento. En un aspecto de la invención, el procedimiento comprende, además, poner en contacto a las células con un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina.

35 En otra realización, la invención proporciona compuestos para tratar células afectadas por el VPH en un paciente o sujeto administrando a un paciente o sujeto un compuesto o una composición farmacéutica descritos en el presente documento. El procedimiento puede comprender, además, poner en contacto a las células con un agente antiviral. El agente antiviral puede ser un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox o podofilina. En otro aspecto, el VPH puede ser VPH11, VPH16, VPH18, VPH1, VPH6 o VPH31.

40 Los compuestos para tratar células afectadas por el VPH16 por medio de la administración a un paciente se seleccionan de:



45 El procedimiento puede comprender, además, la administración de un agente antiviral. El agente antiviral puede ser interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox, podofilina, aciclovir y otros fármacos para el herpes/citomegalovirales y fármacos anti VIH.

En otras realizaciones, las poliamidas usadas para tratar células afectadas por el VPH tienen la estructura seleccionada del grupo de:



ImPPβPPPγPPβPPPPβTa;
 ImPPPβPPβγ(NH₂)PPβPPPPβDp;
 ImPPβPPPγ(NH₂)PPβPPPPβTa; (NV1030)
 ImPPβPIPβPPγ(NH₂)PPβPPPPβPPβTa.

5 En otras realizaciones adicionales, las poliamidas son usadas en combinación con otros antivirales, como interferones, (por ejemplo, interferón-γ e interferón-β), imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox, podofilina, aciclovir y otros tratamientos para el herpes/citomegalovirus y fármacos anti VIH. Las poliamidas también pueden ser usadas en combinación con terapia fotodinámica, terapia de radiación y quimioterapia.

10 Para que la invención descrita en el presente documento sea entendida más plenamente, se presentan los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Poliamidas y otros compuestos anti VPH

15 Se diseñó un conjunto de más de 20 poliamidas para seleccionar como dianas regiones ricas en A/T. También se prepararon compuestos de control y análogos marcados por tinción tanto de BOFLX como de FITC para estudios de captación celular. Las vueltas de horquilla se construyeron a partir tanto de ácido gamma-aminobutírico como de ácido (R)-2,4-diaminobutírico (Baird y Dervan, 1998).

20 Los sitios 5'-WWG-3' son importantes para el reconocimiento de las PA, siendo W= A o T. En el área diana E1, el VPH16 tiene varios motivos WWG de reconocimiento (en negrita y numerados 1-5 a continuación). Una variante del VPH 16 tiene una G en el sitio subrayado. Así, no se retiene en la variante la larga secuencia de AT después de 4.

1
2
3
4
5

ATGAATTATTGTAGTT T AGTATTATTATATAAGT (ID. SEC. n° 1)
TACTTAATAACATCAA A TCATAATAATATATTCA (ID. SEC. n° 2)

Los compuestos y los datos de espectroscopia de masa se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de masa espectral de poliamidas

Nº	Compuesto	ME teórica	ME experimental
1036	F ₃ CC(O)PPβPPPPIγ(NH ₂) PβPPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2355	(M+H) ⁺ = 2359,72
1028	ImPPβPPPβPPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 1894	(M+H) ⁺ = 1896,55
1030	ImPPβPPPγ(NH ₂)PPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 1909	(M+H) ⁺ = 1910,94
1029	ImPPPβPPβγ(NH ₂)PPβPPPPβDp	(M+H) ⁺ = 2008	(M+H) ⁺ = 2010,43
1037	ImPPβPIPβPPγ(NH ₂) PPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2540	(M+H) ⁺ = 2542,06
1004	ImPPPβPPβPPγPPPβPPPPβDp	(M+Na) ⁺ = 2747	(M+Na) ⁺ = 2748,50
1035	F ₃ CC(O)PPβPPPβγ(NH ₂) PPPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2161	(M+H) ⁺ = 2165,3
1027	ImPPPβPPβPPγPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2036	(M+M) ⁺ = 2038,48
1003	ImPPPβPPβPPγ {NH..} PPPPPPPPPPCp	(M+Na) ⁺ = 2762	(M+Na) ⁺ = 2762,46
1032	ImPPPβPPβγ(NH ₂)PPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2053	(M+H) ⁺ = 2052,26
1031	ImPPPβPPγPPPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2087	(M+H) ⁺ = 2089,49
1026	ImPPPβPPPγ(NH ₂)PPPβPPPPβDp	(M+H) ⁺ = 2059	(M+H) ⁺ = 2084,32
1020	ImPPβPPPγ(NH ₂)PPPβPPPPβTa (4Ta) *	(M+2H) ²⁺ = 955,45	(M+2H) ²⁺ = 955,46
1033	ImPPPβPPPγ(NH ₂)PPPβPPPPβTa	(M+H) ⁺ = 2104 (precursor protegido por BOC)	(M+H) ⁺ = 2104,16 (precursor protegido por BOC)
1024	ImPPβPPPγ(NH ₂)PPβPPPPβDp	(M+H) ⁺ = 1866	(M+H) ⁺ = 1869,58
1023	ImPPβPPPγPPPβDp	(M+Na) ⁺ = 1873	(M+Na) ⁺ = 1876,82
1022	ImPPPβPPβγPPβPPPPβDp *	(M+H) ⁺ = 1993	(M+H) ⁺ = 1995,68
1002	ImPPPβPPγPPPβPPβDp	(M+H) ⁺ = 1852	(M+H) ⁺ = 1852,3
1005	ImPPPγPPPβTa (1Ta) *	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 755,5	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 755,6
1006	ImPPPγ (NH ₂)PPPβTa (3Ta) *	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 763,5	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 763,1
1007	ImPPPγPPPβTa-FITc (1Ta) *	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 950	(2M+H ₂ +H) ²⁺ = 949,9

Nº	Compuesto	ME teórica	ME experimental
1008	ImPPPPyPPPPpβTa-BOFLX (1Ta) *	$(2M+H_2+Na+H)^{2+} = 960,5$	$(2M+H_2+Na+H)^{2+} = 960,7$
1010	ImPPPPyPPPPpβDp (1Da) *	$(M+H_2+H)^+ = 1467$	$(M+H_2+H)^+ = 1466,8$
1011	ImpplyPPPPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1224$	$(M+ H_2+H)^+ = 1223,9$
1012	ImIIPyIPPPβDp *	$(M+ H_2+H)^+ = 1226$	$(M+ H_2+H)^+ = 1225,8$
1013	ImPPPyPIIPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1224$	$(M+ H_2+H)^+ = 1223,9$
1014	ImβIPyPPPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1174$	$(M+ H_2+H)^+ = 1173,9$
1015	ImβIPyPPPPβDp* ImβIPyPPPPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1173$	$(M+H_2+H)^+ = 1172,9$
1016	ImβIIPyPPPPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1418$	$(M+ H_2+H)^+ = 1417,7$
1017	ImPPlyPIIPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1226$	$(M+ H_2+H)^+ = 1225,8$
1018	ImβIPPylPIIPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1419$	$(M+ H_2+H)^+ = 1418,5$
1019	ImPPIPyIPIPPβDp*	$(M+ H_2+H)^+ = 1470$	$(M+ H_2+H)^+ = 1469,5$
1021	ImIPIyPIPPβDp*	$(M+H_2+H)^+ = 1226$	$(M+H_2+H)^+ = 1225,9$
1025	ImPPPβPPPyPPPβPPpβDp	$(M+H)^+ = 2044$	$(M+H)^+ = 2045,76$
1034	F ₃ CCOPIβPPyPPPβPPpβTa	$(M+H)^+ = 1761$	$(M+H)^+ = 1768,21$
1038	OHC-PPPPβDp*	$(M+H)^+ = 690$	$(M+H)^+ = 690,3$
1039	OHC-PPPPPPβDp*	$(M+H)^+ = 934$	$(M+H)^+ = 934,5$

: El PM fue determinado por medio de LCMS-ESI o sonda ESI directa. Todos los compuestos sin el asterisco fueron analizados por MALDI-MS.

(M+ H₂+H)⁺: A veces, las condiciones de la espectroscopia de masa provocan que ocurra una aparente "hidrogenación en fase gaseosa" de las poliamidas, lo que lleva a un PM de M + 2. Este fenómeno fue observado previamente por James K. Bashkin con otras moléculas de poliamidas heteroaromáticas. Los estudios de RMN del material a granel mostraron previamente que no había presente ninguna especie hidrogenada en las muestras disueltas de los compuestos.

La poliamida 1011 fue descrita previamente en la Solicitud Internacional de PCT WO04/099131; las poliamidas 1012, 1014, 1017 y 1021 han sido descritas en la Solicitud Internacional de PCT WO98/37067; las poliamidas 1005, 1006, 1007, 1008 y 1020 fueron descritas en la Solicitud Internacional de PCT WO05/033282.

Las poliamidas fueron sometidas a ensayo en células que mantenían ADN de VPH16 y comparadas con otros tratamientos antivirales. Hay disponibles varios tratamientos antivirales para tratar lesiones inducidas por el VPH. El cidofovir es un fosfonato nucleósido acíclico que ha demostrado cierta efectividad contra la papilomatosis respiratoria recurrente (RRP), enfermedad infrecuente de las vías respiratorias causada por una infección de VPH (Snoeck et al., 1998, J. Med. Virol. 54(3): 219-225). El cidofovir se usa en el tratamiento clínico por medio de una inyección directa en las lesiones laríngeas. El cidofovir y el interferón son las dos opciones primarias para el tratamiento de esta grave enfermedad. La comparación de la actividad antiviral del cidofovir y del interferón y con poliamidas que tienen actividad antiviral hacia el VPH16 indica que la Cl₅₀ de las poliamidas sometidas a ensayo es al menos 1/1000 menor que la Cl₅₀ del cidofovir y del interferón y (INFy) (Fig. 1).

Se cultivaron células que mantenían ADN de VPH 16 durante 72 horas en presencia de cidofovir, interferón y o poliamida. A continuación, el ADN viral fue cuantificado usando la PCR de tiempo real y comparado con cultivos de control tratados con vehículo (DMSO). Tal como se muestra en la Figura 1, el cidofovir resultó en una pérdida de aproximadamente el 40% del contenido total de ADN de VPH (pero solo con concentraciones muy altas). (La Cl₅₀ es la concentración del compuesto requerida para una inhibición del 50% de la replicación viral *in vitro*). Estos resultados concuerdan favorablemente con un estudio previo de los efectos del cidofovir sobre el ADN episómico del VPH (Spanos et al., 2005. Ann Oto. Rhino. Laryngol. 114(11): 840-846).

En cambio, las poliamidas causaron una pérdida mucho más significativa del contenido de ADN episómico viral con concentraciones significativamente inferiores (véanse la Fig. 1 y la Tabla 4). De hecho, se demostró que el NV1028 reduce los episomas de VPH hasta niveles indetectables por QPCR cuando las células fueron expuestas a concentraciones de solo 5 μM. (200 ng de ADN fue la cantidad introducida para la reacción de PCR). El NV1028 tiene una Cl₅₀ de 0,1 μM contra el VPH6. Estos resultados demuestran que los compuestos de la invención poseen una potencia considerablemente superior en cultivos celulares a la de un fármaco que se está usando en la actualidad en el campo clínico para el tratamiento de lesiones causadas por el VPH. En estos ensayos, las poliamidas presentaron aumentos en potencia con respecto al interferón, que, además, es citotóxico. Los resultados se muestran en la Fig. 1 para el interferón y, y se obtuvieron resultados similares con interferón β.

Los compuestos fueron sometidos a ensayo inicialmente en busca de los efectos sobre los niveles de ADN de episomas de VPH16 en células W12E por medio de Q-PCR (Taqman™) en 3 intervalos de concentración (0,1,1 y 10 μM). Las células W12E son una línea celular de queratinocitos cervicales identificada por vez primera por M. Stanley (Universidad de Cambridge), y luego optimizada por P. Lambert (Universidad de Wisconsin). A continuación, aquellos compuestos que dieron evidencia de una inhibición dependiente de la dosis a estos concentraciones fueron sometidos a ensayo usando un mínimo de 6 dosis en un intervalo de concentración de 1.0 nM a 10 μM para poder obtener valores de Cl₅₀. En todos los casos (pruebas iniciales y pruebas de seguimiento de Cl₅₀), el ensayo de dosis

5 se llevó a cabo por triplicado. Para cada compuesto, se trazó la curva logarítmica de dosis-respuesta y se generó una curva de ajuste óptimo mediante Microsoft Excel, Xlfit (versión 2.0; ID Business Solutions, Reino Unido), que permite el ajuste de curvas usando regresión no lineal. Los datos fueron trazados como porcentaje de inhibición en función de la dosis, y se definió la CI_{50} como la concentración de fármaco requerida para una reducción del 50% en el ADN de VPH con respecto a controles tratados con vehículo (DMSO al 0,1%). Además, todos los experimentos se realizaron por triplicado múltiples veces. Los datos fueron entonces combinados, se calcularon las CI_{50} , y se determinaron las variancias para revelar la adecuación de los datos al modelo y su fiabilidad. En la Fig. 2 se muestran los datos para una de las poliamidas más potentes, la 1028. Todos los experimentos sobre compuestos activos se realizaron de esta manera.

10 En la Fig. 2B se muestra una disminución dependiente de la dosis en el número de copias de ADN de VPH16 después del tratamiento con poliamida (n = 4 experimentos independientes). No se observó ningún efecto acompañante en la viabilidad celular (ensayo de MTT). Las células fueron cultivadas durante 5 días en presencia de poliamida; % de viabilidad celular = (fármaco OD590/control OD590) × 100; n = 3.

La Tabla 4 presenta un resumen de poliamidas ejemplares e inactivas y de las CI_{50} contra el VPH16.

15

Tabla 4. CI_{50} del VPH 16 de las poliamidas

Nº	Compuesto	Nº de diana de VPH-16	CI_{50} del VPH-16
1036	F ₃ CC(O)PPβPPβPIγ(NH ₂) PβPPβPPPβPβTa	5	+++
1028	ImPPβPPPyPPβPPPPβTa	1,4	++
1030	ImPPβPPPy(NH ₂)PPβPPPPβTa	1,4	++
1029	ImPPPβPPβγ(NH ₂)PPβPPPPβPβDp	4	++
1037	ImPPβPIPPPy(NH ₂)PPβPPPPβPPPPβTa	3	++
1004	ImPPPβPPβPPPyPPPPPPPPβDP	4	++
1035	F ₃ CC(O)PPPPPPPy(NH ₂) PPPβPPPPβPβTa	1,5	++
1027	ImPPPβPPβγPPβPPPPβPβTa	4	++
1003	ImPPPβPPβPPPy(NH ₂)PPPβPPPPβPPPPβDp	4	++
1032	ImPPPβPPγ(NH ₂)PPβPPPPβPβTa	4	++
1031	ImPPβPPPyPPPPPPβPβTa	4	++
1026	ImPPβPPPy(NH ₂)PPPβPPPPβPβDp	4	++
1020	ImPPβPPPy(NH ₂)PPPβPPPPβTa (4Ta)	1,4	+
1033	ImPPPβPPPy(NH ₂)PPPβPPPPβPβTa	4	+
1024	ImPPβPPPy(NH ₂)PPβPPPPβPβDp	1,4	+
1023	ImPPβPPPyPPβPPPPβPβDp	1,4	+
1022	ImPPPβPPβγPPβPPPPβPβDp	4	+
1002	ImPPPβPPPyPPPPPPPPβDp	1,4	NA
1005	ImPPPyPPPPPPβTa (1Ta)	1,4	NA
1006	ImPPPy(NH ₂)PPPPPPβTa (3Ta)	1,4	NA
1007	ImPPPyPPPPPPβTa-FITC (1Ta)	1,4	NA
1008	ImPPPyPPPPPPβTa-BOFLX (1Ta)	1,4	NA
1010	ImPPPyPPPPPPβDp (1Da)	1,4	NA
1011	ImPIyPPPPβDP	2	NA
1012	ImIIPyPPPPβDp		NA
1013	ImPPPyPIIPβDp		NA
1014	ImβIPyIPPPβDp		NA
1015	ImβIPyPPPPβDp		NA
1016	ImPIIPyPPPPPPβDp		NA
1017	ImPIyPIIPβDp		NA
1018	ImPIIPyPIIPβDp		NA
1019	ImPIIPyPIIPβDp		NA
1021	ImPIyPIIPβDp		NA
1025	ImPPPβPPPyPPPPPPPPβDp	4	NA
1034	F ₃ CCOPβPPPyPPPPPPPPβTa		NA
1038	OHC-PPPPβDp		NA
1039	OHC-PPPPPPβDp		NA

+++ indica una CI_{50} de 0,1 o menos; ++ indica una CI_{50} entre 0,1 y 1,0; + indica una CI_{50} de 1,0 o mayor; NA indica que el compuesto era No Activo, es decir, no se obtuvo ninguna respuesta de dosis.

Sorprendentemente, el NV1020 fue efectivo contra el VPH16, con una CI_{50} entre 0,1 y 1,0 μM.

20 Las poliamidas más cortas y las estructuras poliamidicas menos tradicionales (Laemmli y Janssen, 2002a; Laemmli y Janssen, 2002b; Maeshima et al., EMBO J., 20, 3218-28, 2001) fueron inactivas en este estudio. Entre los

compuestos inactivos estaba 3-Ta, ImPPPP γ (NH₂)PPPP β Ta, que contiene la horquilla 2,4-diamino: γ (NH₂). El compuesto 3-Ta reconoce dianas similares de ADN que 2-Ta y 4-Ta, salvo que 3-Ta se enlaza únicamente con 8 pares base, mientras que 2-Ta y 4-Ta se enlazan con 10 pares base.

Ejemplo 2: Ensayo de toxicidad de las poliamidas: No se alcanza la CT₅₀ a 300 μ M

5 El ensayo de toxicidad se llevó a cabo para 3 poliamidas separadas. Se usaron dos ensayos diferentes con hepatoma de rata porque son estándares industriales para predecir la toxicidad *in vivo*. Los ensayos de ATP y de integridad de membrana se describen con detalle en lo que sigue. Así, se sembraron células (H4IIE) de hepatoma de rata en placas de 96 pocillos y fueron cultivadas en un medio que contenía suero bovino al 20%. Después de un periodo de equilibrado de 48 horas, las células fueron tratadas con los compuestos del ensayo a diversas concentraciones durante 24 horas a 37°C en un 5% de CO₂. Se comprobó la toxicidad de los compuestos poliamídicos en dos ensayos separados. No se logró una CT₅₀ (concentración necesaria para matar la mitad de las células) para ninguna de las poliamidas sometidas a ensayo en un amplio intervalo de concentraciones explorado. (Se estimó que la CT₅₀ del NV1028 era mayor que 300 μ M.) Por otra parte, los compuestos de control rotenona y camptotecina (datos no mostrados) produjeron valores de CT₅₀ de 0,49 μ M (rotenona) y 5,0 μ M (camptotecina) en el ensayo de integridad de membrana, y de 0,05 (rotenona) y 0,9 (camptotecina) en el ensayo de ATP. Además, el cidofovir produjo una CT₅₀ de 750 μ M en el ensayo de MTT.

Sigue una breve descripción de los ensayos.

A. Niveles intracelulares de ATP

20 Se determinaron los niveles celulares de trifosfato de adenosina (ATP) usando un ensayo basado en una reacción entre ATP + D-luciferina + oxígeno catalizada por luciferasa para dar oxiluciferina + AMP + PPi + CO₂ + luz. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente. En vez de una señal de tipo "flash", que tiene una vida media muy corta, este ensayo utiliza una tecnología de "brillo" patentada que extiende la vida media de la señal hasta 5 horas. Además, un reactivo único de la lisis celular inhibe las ATPasas endógenas y, por lo tanto, estabiliza el ATP celular evitando su degradación a ADP. El ATP está presente en todas las células vivas y declina rápidamente con la muerte celular. Además, este ensayo, en combinación con el ensayo de MTT, proporciona un indicador de la actividad mitocondrial y el estado energético de la célula.

30 Al final del periodo de exposición de 24 horas, se retiró el medio de las células y se añadió en cada pocillo el tampón de ATP de lisis celular. Las placas fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta que se necesitaran. El día del análisis, las placas fueron descongeladas y se preparó una curva de calibración con ATP en la misma matriz líquida que las muestras. El ATP fue cuantificado añadiendo una solución de sustrato de ATP y leyendo luego la luminiscencia en un lector Packard Fusion de luminiscencia o un lector de placas equivalente.

B. Integridad de membrana / Procedimiento modificado de yoduro de propidio

35 Se usó un procedimiento modificado de yoduro de propidio (PI) para evaluar la proliferación/viabilidad celular. Esta tinción de enlace con ácidos nucleicos específicos fluoresce cuando se intercala dentro de los ácidos nucleicos. El desplazamiento de 15 nm potencia la fluorescencia del PI en aproximadamente 20 veces, mientras que los máximos de excitación están desplazados 30-40 nm. Durante los experimentos de desarrollo del procedimiento, se determinó que Triton-X-100 era la mejor disolución para permeabilizar las células H4IIE, permitiendo con ello el acceso del PI al ARN y el ADN intracelulares. La fluorescencia se midió usando un lector Packard Fusion de placas con 540nm de excitación y 610 nm de emisión.

40 C. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], descrito por primera vez por Mosmann en 1983, se basa en la capacidad de una enzima de deshidrogenasa mitocondrial de células viables de escindir los anillos de tetrazolio del MTT amarillo pálido y formar cristales azul oscuro de formazán que son en gran medida impermeables a las membranas celulares, resultando así en su acumulación dentro de las células sanas. La solubilización de las células mediante la adición de un detergente resulta en la liberación de los cristales, que son solubilizados. El número de células supervivientes es directamente proporcional al nivel del producto de formazán creado. El color puede ser entonces cuantificado usando un simple ensayo colorimétrico. Los resultados pueden ser leídos en un espectrofotómetro de escaneado de pocillos múltiples (lector ELISA) (Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods, 65, 55-63, 1983).

El ADN viral de VPH es cuantificado en células W12E cultivadas, tal como se ha descrito previamente, usando cebadores y sondas Taqman (Peggy Garner-Hamrick and Fisher, C, HPV Episomal Copy Number Closely Correlates with Cell Size in Keratinocyte Monolayers, Virology 2002; 301: 334-341).

Ejemplo 3: Ensayo de poliamidas

Se ha demostrado de forma reproducible que las poliamidas obedecen las reglas del enlace de ADN, que han sido desarrolladas en gran medida por Dickemon y Dervan. Las poliamidas de esta invención poseen constantes de enlace elevadas entre las poliamidas y sus secuencias coincidentes de ADN. En estos experimentos, la secuencia de ADN fue inmovilizada en un chip BIAcore por afinidad biotina-avidina, y se examinaron tanto la cinética como la termodinámica del enlace de las poliamidas.

Ensayos de cultivo celular

Se usó un ensayo fuertemente cuantitativo de PCR de tiempo real (Garner-Hamrick y Fisher, *Virology*, 301, 334-41, 2002) para medir los niveles de ADN episómico del VPH 16 tras el tratamiento de las células con poliamidas. Los queratinocitos que mantenían episomas de VPH16 fueron tratados con concentraciones crecientes de poliamidas. En la Fig. 3 se muestran cinco poliamidas, que presentan efectos dependientes de la dosis sobre niveles absolutos de ADN de VPH 16. Es notable que las dosis mayores de 1031, 1037, 1028 y 1004 dieron como resultado la casi completa eliminación del ADN viral detectable en algunos experimentos (Fig. 3).

Por varias razones, no es probable que los resultados anti VPH16 sean causados por toxicidad celular, siendo una de ellas que, en todos los experimentos, las células eran morfológicamente normales y siguieron proliferando normalmente, según se determinó por recuento y densidad celulares. La viabilidad celular también fue evaluada de forma rutinaria con el ensayo de MTT. El ensayo empleado en los experimentos de la Fig. 3 utilizó amplificación Taqman™ de PCR del gen L1 del VPH 16 (Garner-Hamrick and Fisher, *Virology*, 301, 334-41, 2002).

Se usaron varios enfoques alternativos para confirmar los efectos de los compuestos de los solicitantes en el ADN viral. Estos procedimientos adicionales incluyen normalización al ADN total, preparación del ADN mediante diferentes procedimientos, incluyendo columnas de centrifugado Qiagen DNeasy (ADN genómico total), preparaciones DNAzol de ADN genómico total y Hirt (preparaciones de ADN de bajo PM; (Hirt, (1967), *J Mol Biol.* 26:365-9). En todos los casos, los resultados de los solicitantes han sido completamente coherentes con la reducción del contenido de ADN episómico en células por medio de los compuestos de los solicitantes. Por último, la transferencia de Southern confirmó que las disminuciones en ADN viral, medido usando Q-PCR, son coherentes con procedimientos más tradicionales, aunque menos cuantitativos. La Fig. 4 muestra una transferencia de Southern que muestra una eliminación dependiente de la dosis del ADN episómico de VPH de una línea celular de queratinocitos humanos que albergaba ADN de VPH expuesto en cultivo a una poliamida. El DMSO es el vehículo de control; ADN de VPH indica el ADN de VPH linealizado usado para generar la sonda de hibridación mediante marcación aleatoria con cebador con DIG-dUTP (Roche); tras la hibridación, se incubó la transferencia con conjugado anti DIG-AP y se detectó el ADN de VPH usando sustrato ECF (Amersham) y un dispositivo Storm de formación de imágenes por fosforescencia. El NV1020 (indicado por las calles marcadas 1 μ M y 10 μ M), con una CI_{50} aproximada de 1,3 μ M, dio la disminución esperada en el contenido de ADN episómico. Otros compuestos NV han mostrado de forma similar la disminución esperada en ADN viral mediante la transferencia de Southern.

También se descubrió que las poliamidas eran más potentes que las poliamidas netropsina y distamicina, existentes de forma natural, y que, a diferencia de la netropsina y la distamicina, tenían poco efecto en la viabilidad celular (Fig. 5). La Figura 5 compara los efectos relativos de 1037, distamicina A y cidofovir en el ADN viral de VPH y en la viabilidad celular. La poliamida 1037 muestra una enorme reducción en los niveles de ADN viral en concentraciones que tienen poco impacto en la viabilidad celular. El cidofovir y la distamicina A son solo efectivos contra el ADN de VPH en concentraciones elevadas que también afectan a la viabilidad celular.

Ejemplo 4: Efecto de la retirada de una poliamida sobre los episomas de VPH16

Este experimento fue llevado a cabo para determinar si el aumento en los episomas de VPH 16 se mantiene después de que una poliamida se retira de las células. Las células fueron puestas en placas el día 1 del experimento y se añadieron 10 μ M de NV1028; las células fueron cultivadas durante 3 días, momento en el que las células fueron lavadas y se añadió 1028 adicional; se llevó a cabo un subcultivo en presencia de 1028 en los días indicados (eje x) durante 15 días; el fármaco se eliminó por lavado el día 17 y las células fueron subcultivadas en ausencia del fármaco durante 2 semanas para verificar la recuperación del ADN episómico del VPH16. Las células W12E de control fueron recibidas en DMSO al 0,1%. La Fig. 7 demuestra que el ADN episómico del VPH se recupera algo cuando se retira una poliamida, pero la recuperación no se aproxima a los niveles de control en al menos dos semanas después de la retirada de la poliamida.

Ejemplo 5: Control de la captación celular y la localización nuclear para las poliamidas

Tal como se ha descrito en lo que antecede, las poliamidas de esta invención se localizan fácilmente en el núcleo de los queratinocitos. Sin embargo, en otros tipos de células, incluyendo diversas células transformadas, las poliamidas se localizan a menudo dentro de los compartimentos vesiculares tras el tratamiento de las células. Se obtuvieron la captación de poliamidas y la distribución celular estudiando los efectos de la carga y la acidez totales de las poliamidas y la influencia sobre la captación de inhibidores de resistencia a múltiples fármacos (Crowley et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1565-70, 2003).

Los estudios revelaron que las poliamidas marcadas con BODIPY se acumulan en vesículas ácidas, principalmente liposomas, en el citoplasma de las células de mamíferos. Este es un fenómeno observado con muchos fármacos y compuestos que son bases suaves. El verapamilo, un agente que trastorna la homeostasis de las vesículas ácidas, bloqueó la acumulación vesicular y llevó a la acumulación nuclear de la poliamida marcada con BODIPY. Estos resultados sugieren que el grupo básico amina encontrado comúnmente al final de las cadenas de poliamidas sintéticas es responsable de su acumulación en vesículas citoplasmáticas en las células de mamíferos. En apoyo de esta sugerencia, los solicitantes descubrieron que modificar la carga sobre una poliamida sustituyendo el resto BODIPY en la cola amina con un resto de fluoresceína generaba una nueva molécula que no se acumulaba en las vesículas citoplasmáticas, sino que se localizaba más bien en el núcleo de la célula.

Dado que el ADN nuclear es la diana de la poliamida, las poliamidas pueden verdaderamente ser compuestos útiles para regular la expresión de genes en células de mamíferos cuando se usa una de las dos estrategias esbozadas aquí para dirigir poliamidas al núcleo (Crowley et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 13, 1565-70, 2003). (Véase Best et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 12063-68, 2003; Edelson et al., Nucl. Acids Res., 32: 2802-18.2004).

Ejemplo 6: Identificación de poliamidas para el VPH18

Las poliamidas de esta invención de enlace con el ADN son dirigidas contra el VPH16 y disminuyen potente y enormemente los niveles de ADN episómico del virus en los queratinocitos humanos. Aquí se describen enfoques para encontrar agentes antivirales para el VPH18. En un enfoque, la manera en la que el VPH se une a los cromosomas anfitriones será usada para seleccionar los VPH como diana.

Las poliamidas se preparan mediante los procedimientos de la bibliografía (por ejemplo, Belitsky et al., Bioorg. Med. Chem., 10, 2767-74, 2002), y el procedimiento descrito más abajo en el Ejemplo 8, usando bloques constituyentes sintetizados en las propias instalaciones. Estos incluyen síntesis de fase sólida, como la de Merrifield, y procedimientos de disolución. Todos los productos finales serán purificados mediante HPLC a una pureza superior al 98%, luego divididos en partes alícuotas, liofilizados y almacenados congelados hasta su uso. La capacidad de las poliamidas de enlazarse con sus secuencias nominales de ADN será evaluada por medio de un análisis BIAcore. Se preparan cantidades suficientes para la toxicidad preliminar.

El diseño de poliamidas para que seleccionen como diana regiones ricas en A/T del VPH18 se basa en las cuatro reglas de reconocimiento conocidas. La β -alanina, la vuelta y la cola amino reconocen todos los nucleótidos A o T, y el imidazol reconoce la G. Tres aspectos importantes de las poliamidas efectivas contra el VPH incluyen: (1) secuencias de poliamidas que dan como resultado la eliminación del VPH18; (2) descubrimiento de longitudes de poliamidas que equilibran la eficacia y la captación; (3) descubrimiento del lugar en el que los grupos de β -alanina se incorporan de forma óptima en la poliamida.

Tabla 5. Poliamidas para VPH18.

1	ImPPI- γ -PPPPP- β -Dp	8 pares base
2	ImPPPIPPPI- γ -PPPPPPPPP- β -Dp	13 pares base
3	ImPPPPPIPP- γ -PPPPPPPPPP- β -Dp	13 pares base
4	ImPPPPPPPIPPP- γ -PPPPPPPPPPPP- β -Dp	16 pares base
5	ImPPPPPPPPPEPPPPPP- γ -PPPPPPPPPPPPPP- β -Dp	17 pares base
6	Im-P-I(P) ₁₀ - γ -P- ₁₄ -P-Dp	17 pares base
7	Im-(P) ₁₀ - γ -P- ₁₁ - β -Dp	14 pares base

Todas las poliamidas mostradas en la Tabla 5, con la excepción del compuesto 1, son muy largas. Se preparan versiones de cada poliamida con beta-alaninas (β) incorporadas para aliviar la tensión en la cadena principal de la poliamida debido a ligeras imperfecciones que se presentan en el ajuste con el ADN con estas largas moléculas. No hay reglas establecidas sobre el lugar en el que deberían colocarse las β -alaninas, salvo que interactúan desfavorablemente con G. La Tabla 6 da un conjunto representativo de variaciones ejemplares en la composición de las poliamidas, con una β añadida a ambos lados de la vuelta γ .

Tabla 6. Secuencias de poliamida basadas en un compuesto modificado con β -alanina.

Im-PPP- β -PPP- β -IPPP- β -PP- γ -PPP- β -PPP- β -PPP- β -PPP- β -Dp
Im-PPP- β -PPP1- β -IPPP- β -PP- γ -PPP- β -PPP- β -PPP- β -PPP- β -Dp
Im- β -PPP- β -PIIP- β -PP- γ -P- β -PPPP- β -PPP- β -PPP- β -PPP- β -Dp
Im-P- β -PPPP- β -PEPP- β -PPP- γ -VPPP- β -PPPP- β -PPP- β -P- β -Dp

Además, se preparan versiones truncadas de las poliamidas y se las somete a ensayo. Esto puede mejorar la captación y contribuirá a determinar parámetros para predecir la longitud en función de la selectividad. La Tabla 7 da ejemplos de poliamidas truncadas basadas en la poliamida 5, una de las dos poliamidas más largas de la Tabla 5.

Tabla 7. Poliamida truncada reconociendo un par base (bp) menos por entrada

Análogas más cortas de la poliamida "madre"	
ImPPPPPPPPPEFPPPP- γ -PPPPPPPPPPPPPP- β -Dp	Un par base más corta

ImPPPPPPPIPPPP-γ-PPPPPPPPPPPP-β-Dp	Dos pares base más corta
ImPPPPPPPIPPPP-γ-PPPPPPPPPPPP-β-Dp	Tres pares base más corta
ImPPPPPPPIPP-γ-PPPPPPPPPPPP-β-Dp	Cuatro pares base más corta

Los compuestos de poliamidas de la invención son también útiles como herramientas para sondear el ciclo vital del VPH.

Se cultivan queratinocitos humanos, incluyendo los que mantienen episomas de VPH, en células J2 3T3 tratadas con mitomicina C que contienen tres partes del medio Eagle (DMEM) modificado de Dulbecco y una parte de medios F12, modificación de los solicitantes de los procedimientos publicados (Rheinwald y Green, 1975). Se complementa el medio (medio E) con 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 10 ng/mL de toxina de cólera, 5 µg/mL de insulina, 24 µg/mL de adenina, 5 µg/mL de transferrina, 5 µg/mL de 3,3',5-triyodotironina (T3), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 1% de penicilina-estreptomocina, y 5% de suero bovino fetal (FBS). Todas las células son transferidas en un 70% de confluencia con una relación de separación de 1:5.

Las poliamidas para el VPH18 se disuelven en 10 mM en DMSO al 100% y se diluyen con H₂O hasta 1 mM. Se añaden las poliamidas a células en medio E con concentraciones finales de 0,1-10 µM, con concentraciones finales de DMSO del 0,1%. Como controles, se incuban células con medio E normal y medio E que contiene el DMSO "vehículo" al 0,1%. Los niveles de ADN de VPH son cuantificados entonces según los procedimientos publicados previamente (Garner-Hamrick y Fisher, *Virology*, 301, 334-41, 2002). Después de la incubación, se cosechan las células de las placas, ya sea por tripsinización o por lisis directa con tampón de digestión de la proteinasa K (Tampón PK: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 0.1 mg/mL proteinasa K). Las células tripsinizadas son contadas en un hemocitómetro y pildorizadas por centrifugación. Se aísla el VPH episomático por medio del procedimiento de Hirt (Hirt, 1967) y las pildoras de células son lisadas en SDS al 0,6% con 10 mM de EDTA. A continuación, se añade NaCl hasta una concentración final de 1 M. Tras una incubación durante la noche a 4°C, los precipitados que contienen el ADN cromosómico son centrifugados y el ADN episomático precipita por la adición de isopropanol. Las células lisadas directamente en tampón PK son transferidas a tubos de microcentrifugadora e incubados a 50°C durante 2 horas. Entonces se extraen lisatos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugan por medio de un gel de bloqueo de fase (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). A continuación, se precipita el ADN total con 0,3 M de NaOAc y 2,5 vol. de etanol y se resuspende en tampón Tris-EDTA (TE).

Acto seguido, los niveles de ADN viral son cuantificados según variaciones sobre los procedimientos publicados previamente por los solicitantes (Garner-Hamrick y Fisher, *Virology*, 301, 334-41, 2002). Se lleva a cabo una PCR cuantitativa usando tecnología de PCR de tiempo real en un detector de secuencias AD1 PRISM 7700. Todos los cebadores y todas las sondas fueron diseñados usando Primer Express 1.0 (ABI). Para el VPH18, se diseñaron conjuntos de cebador-sonda dentro del gen L1: codificante 5'-TTTGGTTCAGGCTGGATTGC (ID. SEC. N° 3), no codificante 5'-GCAGATGGAGCAGAACGTTTG (ID. SEC. N° 4), sonda 5'-TCGCAAGCCCACCATAGGCC (ID. SEC. N° 5). También se diseñaron conjuntos cebador-sonda del VPH31 para PCR dentro del gen L1: codificante 5'-CTGCTATTTTTGGAAGATTGGAAT (ID. SEC. N° 61, no codificante 5'-GGCCTGTGAGGTGACAAACC (ID. SEC. N° 7), sonda 5'- TTGGATTGACCACACCTCCGTCAGGTT (ID. SEC. N° 8).

Todos los cebadores y todas las sondas se sintetizan y se purifican por HPLC de Applied Biosystems (Foster City, California). Las sondas de VPH están marcadas con la tinción indicadora de 5' FAM (6-carboxi-fluoresceína) y la tinción extintora de 3' TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina). Se genera una curva estándar usando un intervalo de 10⁸ a 10 copias/reacción de ADN genómico clonado de VPH31 o VPH18 usando la siguiente fórmula: $(1,82 \times 10^{15}) (\mu\text{g}/\mu\text{L de ADN estándar})/(\text{longitud en pares base})^2 = \text{copias}/\mu\text{L de ADN estándar}$. Las reacciones de PCR contienen concentraciones finales de Universal Master Mix 1× (PE Applied Biosystems), 200 µM de cada cebador y 250 nM de sonda (PE Applied Biosystems) en un volumen de reacción de 25 µL. Cada muestra de ADN aislado por el procedimiento de Hirt es analizada en reacciones triplicadas en busca de VPH episomático. Se determina copias/reacción a partir de la curva estándar, y se determina copias/célula según las fórmulas siguientes: $(\text{copias/reacción})/(\text{disolución de ADN})/(\text{n}^\circ \text{ total de células}) = \text{copias/célula}$.

Ejemplo 7: Evaluaciones iniciales de toxicidad *in vitro*

Las poliamidas que reducen significativa los niveles de ADN del VPH18 pueden ser sometidas a ensayo en una serie de estudios de seguimiento. Los estudios de seguimiento requerirán la reparación de las poliamidas a mayor escala.

Se usan transferencias de Southern para confirmar los efectos de las poliamidas en los niveles de ADN del VPH18 que fueron determinados usando tecnología de PCR de tiempo real. Los experimentos se realizan según se ha descrito previamente (Garner-Hamrick y Fisher, *Virology*, 301, 334-41, 2002). Brevemente, se digieren 5 µg de ADN celular total procedente de células tanto tratadas con poliamida como de control con BamHI y es puesto en un gel de agarosa al 0,7%. Después de su transferencia a Nytran (Schleicher & Scheull, Keene, New Hampshire), el ADN es sondeado con VPH 18 de longitud completa purificado por gel que ha sido liberado de pUC19 con BamHI, y cebado aleatoriamente en presencia de DIG-UTP (Roche). Tras la incubación con AP (fosfatasa alcalina) anti DIG, se

detecta el ADN de VPH con sustrato ECF y formación de imágenes por fosforescencia. Los experimentos deberían confirmar los resultados del ensayo Taqman™ w, y proporcionan un ensayo independiente ortogonal de la actividad.

5 En segundo lugar, se determinan valores de concentración efectivos del 50% y el 90% (CE_{50} y CE_{90}) para cada poliamida en un intervalo de dosis de 10 η M a 50 μ M (10 η M, 100 η M, 500 η M, μ M, 5 μ M, 10 μ M y 50 μ M) usando datos de Taqman. Estudios anteriores a los de los solicitantes indican que este intervalo debería proporcionar curvas adecuadas de dosis-respuesta. Se determinan los niveles finales de ADN de VPH por célula para cada concentración de poliamida y se expresan los datos como % de inhibición con respecto a controles tratados con vehículo. A continuación se calculan las CE_{50} usando análisis de regresión no lineal con soporte lógico Sigmaplot.

10 Se monitoriza en queratinocitos humanos normales la toxicidad de cada poliamida que se haya descubierto activa contra el VPH18 usando un ensayo de MTT de viabilidad celular (Denizot y Lang, 1986). Inicialmente, se suministran poliamidas a queratinocitos normales en medios de cultivo con concentraciones de 10 η M, 100 η M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM y 10 mM. Cada conjunto de muestras es suministrado por triplicado, en placas transparentes de 96 pocillos. Se añade una tinción de tetrazolio (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio o MTT, Sigma) a los cultivos celulares 48 horas después de la adición de las poliamidas. Después de 4 horas, las células se aclaran 1× con PBS, y se añade isopropanol que contiene 0,04N de HCl para lisar las células y solubilizar el formazán del MTT. Las placas son leídas en un lector de placas con una longitud de onda de prueba de 570 η m y una longitud de onda de referencia de 630 η m. Los datos se expresan como % de inhibición con respecto a controles tratados con vehículo y, en cuanto al análisis de los efectos en los niveles de ADN de VPH, las CI_{50} son calculadas usando análisis de regresión no lineal con soporte lógico Sigmaplot.

20 A continuación se determina el índice de selectividad para cada poliamida efectiva como la relación entre la CE_{50} y la CI_{50} ($SI = CE_{50}/CI_{50}$). Se considera que un SI de 5 es un punto de partida aceptable.

25 Por último, los efectos de la dosificación múltiple con poliamidas son seguidos *in vitro*. El propósito de estos estudios es calibrar el grado hasta el que las poliamidas pueden limpiar las células de ADN episomático en ausencia de un sistema inmunitario. Aunque se reconoce que, en general, un sistema inmunitario intacto es importante para efectos antivirales óptimos, estos estudios son importantes para contribuir a priorizar y seleccionar compuestos diseñador para eliminar ADN viral en estudios animales. Dado que los regímenes antivirales clínicos típicos duran de 1 a 2 semanas o más, los queratinocitos positivos al VPH 18 pueden ser dosificados durante 6, 9 y 12 días proporcionando poliamida adicional con cada cambio de medio. Los queratinocitos con VPH-18 son transferidos durante el curso de estos experimentos según se necesite. La dosificación puede ser a niveles mayores que el valor de la CE_{50} , con la condición de que esas concentraciones no mostraran previamente ninguna toxicidad significativa. Las células tratadas son recogidas entonces para un análisis de Taqman y también vuelven a ser colocadas en placas en medios frescos. Se permite que las células puestas nuevamente en placas se recuperen durante 7 días adicionales, momento en el que son cosechadas y el contenido de ADN viral es analizado mediante el procedimiento de Taqman. El contenido de ADN viral de las células recuperadas es comparado entonces con el de las células al final del régimen de tratamiento.

35 Los datos para el VPH muestran una notable y potente reducción en los niveles de ADN viral. Sin embargo, es importante hacer notar que la recuperación o "rebote" del ADN viral ocurre después de un solo tratamiento de 48 horas. Las poliamidas fueron retiradas del cultivo a las 48 horas, pero los niveles de ADN de VPH y el subsiguiente "rebote" ocurrieron muchos días después. Por lo tanto, si toda la dosis original de poliamida hubiera seguido estando presente en las células el día 6, habría estado diluida por un factor de al menos cuatro debido a la duplicación celular. Dado que la mayoría de los regímenes antivirales durante al menos de 7 a 14 días (y pueden prolongarse durante meses), se prevé que el enfoque de dosificación múltiple de más duración aquí descrita reducirá la capacidad del VPH de recuperarse *in vitro* tras el tratamiento, y los solicitantes prevén que algunas poliamidas pueden dar como resultado la eliminación del ADN de VPH.

45 Ejemplo 8: Procedimientos de preparación de poliamidas de poli-N-metilimidazol-N-metilpirrol y análogos que carecen de una β -alanina entre el heterociclo C-terminal y el grupo catiónico final C-terminal

50 Un procedimiento de síntesis es preparar un oligómero de poliamida partiendo de resina de síntesis de fase sólida Boc- β -alanina-WANG, añadiendo bloques constitutivos según se requiera para la secuencia de acceso. Preparar ácidos carboxílicos libres en el C-terminal de las poliamidas permite que las moléculas de poliamida sean elaboradas adicionalmente por acoplamiento en fase de disolución en una variedad de estructuras, incluyendo moléculas que carecen de beta-alanina inmediatamente adyacente al grupo polar C-terminal, tal como el o los grupos catiónicos derivados de las di y triaminas alifáticas. Las resinas de Wang, especialmente en forma de Fmoc- β -alanina-Wang, son útiles por esta composición química. Estas resinas incluyen, por ejemplo, los materiales de Novabiochem® escindibles por ácido trifluoroacético denominados resinas NovaSyn®TG HMP, NovaPeg Wang, HMPA-PEGA y HMPA NovaGel™.

55 La poliamida es escindida de la resina con ácido trifluoroacético. Tras la escisión de una poliamida de su resina Wang o similar a Wang por medio de ácido trifluoroacético, se extrae el trifluoroacetato del producto antes del acoplamiento al carboxilato C-terminal y a una nueva amina para generar una amida C-terminal. En general, pueden usarse liofilización y/o intercambio de iones para eliminar el ácido trifluoroacético o su anión antes de una reacción

de acoplamiento amídico para elaborar la poliamida. Además, se prefiere el intercambio de iones para crear la sal clorhídrica (o similar) de una poliamida catiónica antes de la formación del enlace amídico.

A continuación, se hace reaccionar el ácido carboxílico libre resultante en C-terminal en solución con moléculas construidas de componentes estándar para poliamidas que reconocen ADN, salvo que no se sitúa un ácido beta-amino alifático inmediatamente adyacente al grupo catiónico C-terminal.

Ejemplos adecuados de aminas C-terminal incluyen las siguientes estructuras:



en las que X = CH, N; PG = un grupo protector estable a las necesarias condiciones de formación del enlace amídico. Ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen FMOC, Boc y TBDMS.

Los compuestos de poliamidas fueron verificados con espectrometría de masa MALDI después de que se añadiera cada unidad. Las mediciones se realizaron en Peptides International (Louisville, Kentucky). Las poliamidas fueron purificadas hasta una pureza del 98% o mayor mediante HPLC preparativa (requiriéndose a veces la realización de una segunda HPLC preparativa). Las fracciones de HPLC fueron combinadas para dar el producto final tras la HPLC analítica y los espectros de masa (MALDI) mostraron tanto la presencia del producto final como la ausencia de secuencias fallidas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nanovir, LLC

<120> Poliamidas para el tratamiento del virus del papiloma humano

<130> 123918/00006

<160> 8

20 <170> Patentin version 3.3

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Virus del papiloma humano

25 <400> 1 atgaattatt gtagtttagt attattatat aagt 34

<210> 2

<211> 34

<212> ADN

30 <213> Virus del papiloma humano

<400> 2

acttatataa taactactaaa ctacaataat tcatt 34

<210> 3

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

40 <400> 3 tttggttcag gctggattgc 20

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
gcagatggag cagaacgttt g 21

5 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 5
tcgcaagccc accataggcc c 21

15 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 6
ctgctatttt ggaagattgg aat 23

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 7
-ggcctgtgag gtgacaaacc 20

30 <210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

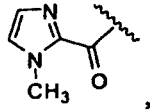
35 <400> 8
ftggattgac cacacctccc tcaggtt 27

REIVINDICACIONES

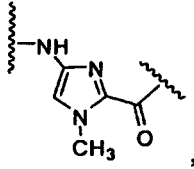
1. Un compuesto seleccionado del grupo constituido por:

- 5 ImPPPβPPβγ(NH₂)PPβPPPβDp;
 ImPPβPIPβPPγ(NH₂)PPβPPPβPPPβTa;
 ImPPβPPPγ(NH₂)PPβPPPβTa;
 ImPPPβPPβγPPβPPPββTa; y
 ImPPβPPPγPPβPPPβTa,

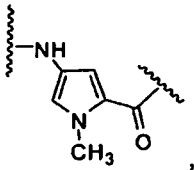
en el que Im es



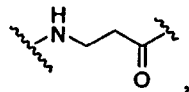
I es



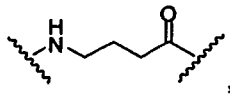
10 P es



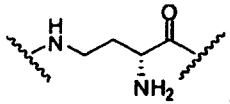
β es



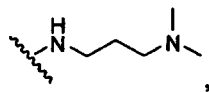
γ es



γ(NH₂) es

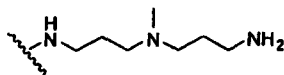


Dp es



15 y

Ta es



2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 que, además, comprende un agente antiviral.
- 5 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 en la que el agente antiviral se selecciona del grupo constituido por un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox y podofilina.
5. Un procedimiento de tratamiento *in vitro* de células afectadas por el virus del papiloma humano (VPH) que comprende poner a las células en contacto con un compuesto descrito en la reivindicación 1.
- 10 6. El procedimiento de la reivindicación 5 que, además, comprende poner a las células en contacto con un agente antiviral.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que el agente antiviral se selecciona del grupo constituido por un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox y podofilina.
- 15 8. El compuesto según se describe en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de células afectadas por el virus del papiloma humano (VPH) en un paciente o sujeto.
9. El compuesto para su uso, según la reivindicación 8, con un agente antiviral.
- 10.El compuesto para su uso, según la reivindicación 9, en el que el agente antiviral se selecciona del grupo constituido por un interferón, imiquimod, cidofovir, formaldehído, glutaral, cimetidina, 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético, bleomicina, podofilox y podofilina.
- 20 11.La composición farmacéutica según se describe en las reivindicaciones 2-4 para su uso en el tratamiento de células afectadas por el VPH en un paciente o sujeto.
- 12.El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en el que el VPH comprende VPH 11, VPH 16, VPH 18, VPH 1 o VPH6.
- 25 13.El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en el que el VPH comprende VPH 11, VPH 16, VPH 18, VPH 1 o VPH6.
- 14.La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11 en el que el VPH comprende VPH 11, VPH16, VPH 18, VPH1 o VPH6.

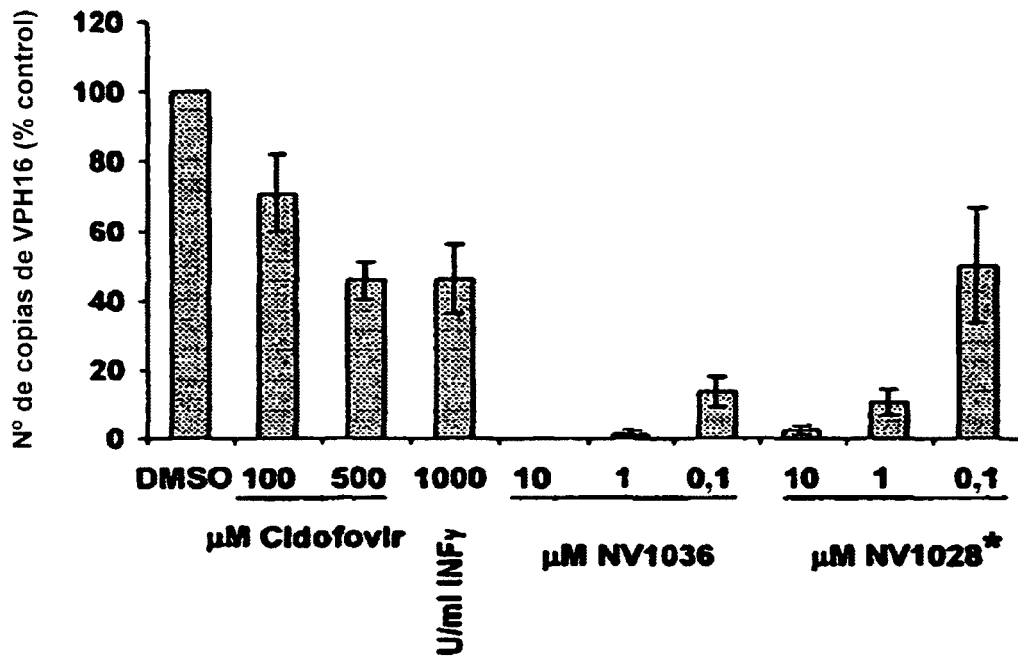
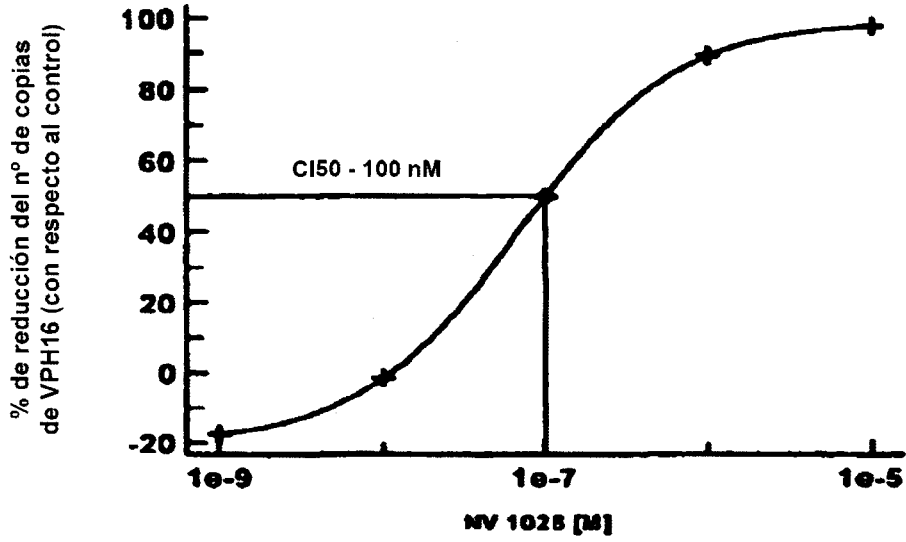


Figura 1

* En algunos experimentos, el número de copias episomáticas de VPH se redujo a niveles indetectables, con concentraciones de poliamida de solo 5 uM (Q-PCR: 200 ng de ADN de entrada)

A



B

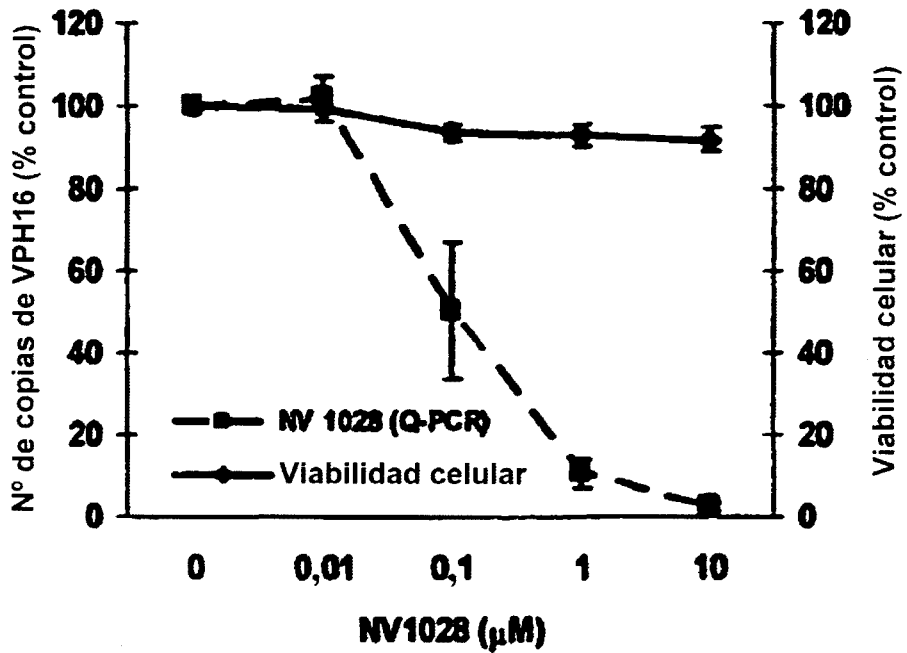


Figura 2

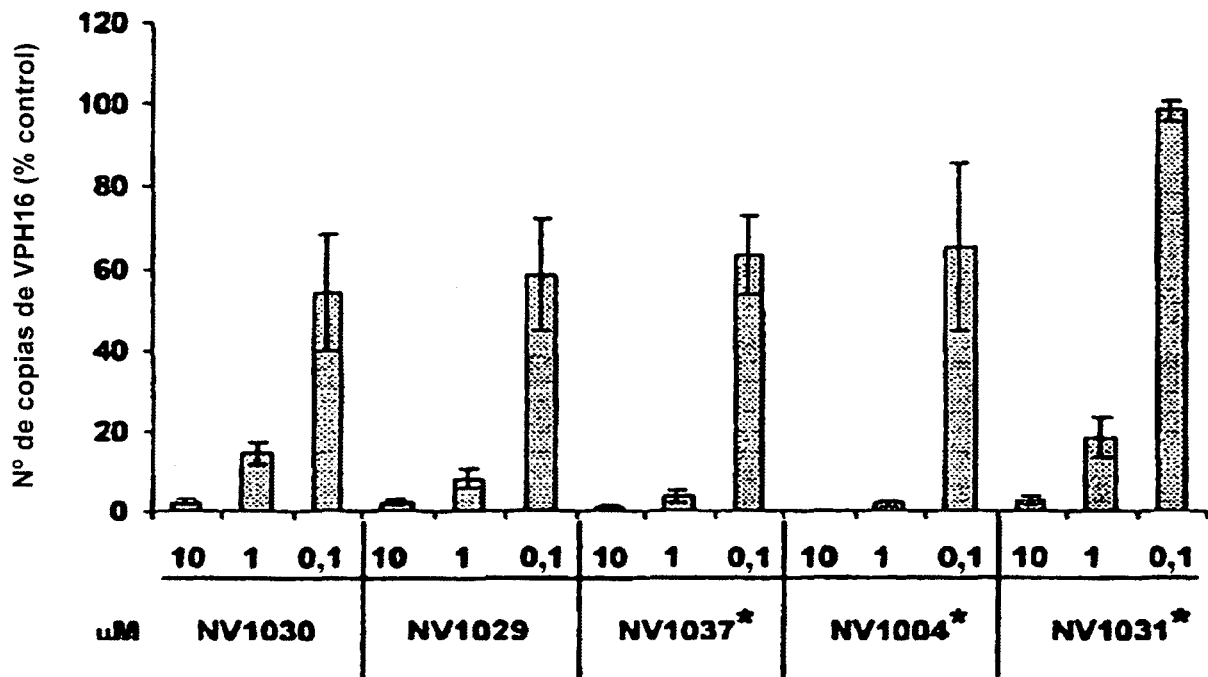


Figura 3

* En algunos experimentos, el número de copias episomáticas de VPH se redujo a niveles indetectables, con concentraciones de poliamida de solo 5 μ M (Q-PCR: 200 ng de ADN de entrada)

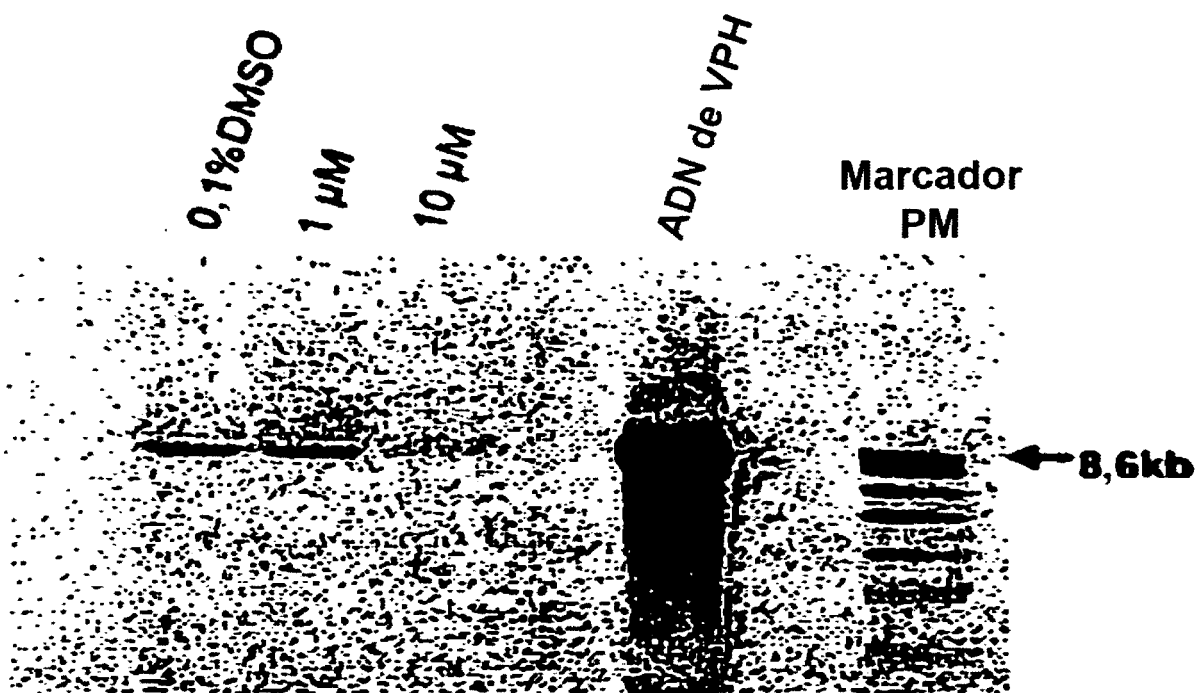
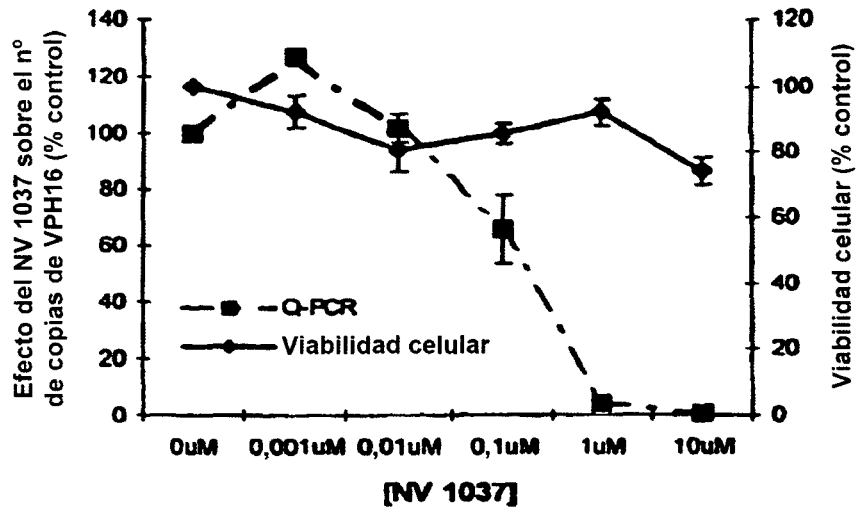
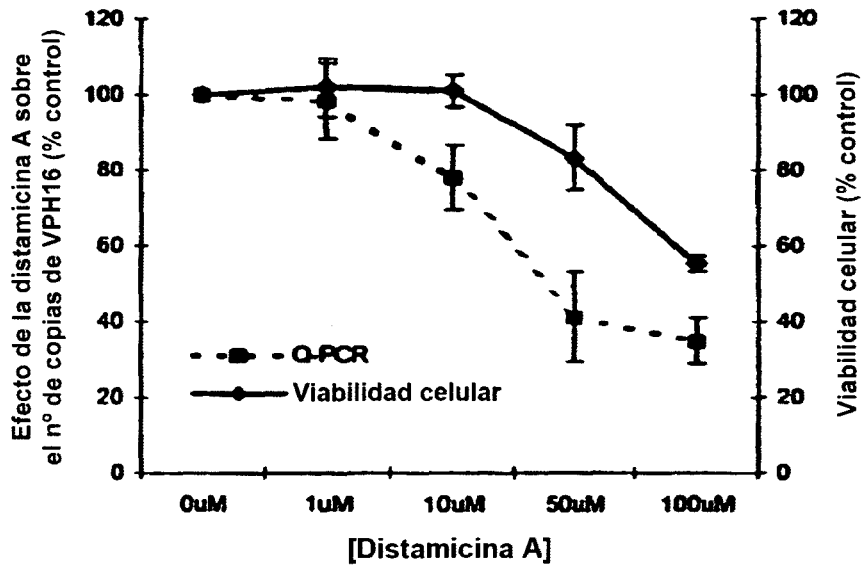


Figura 4

A



B



C

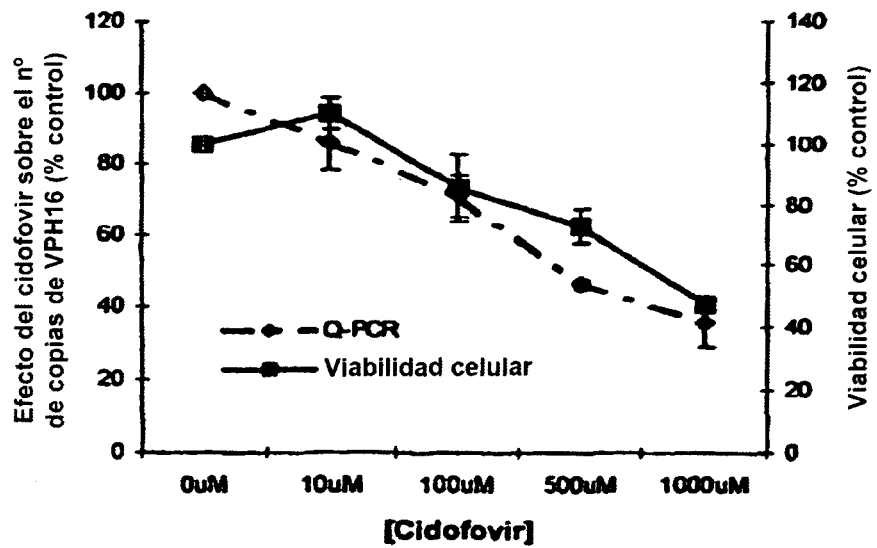
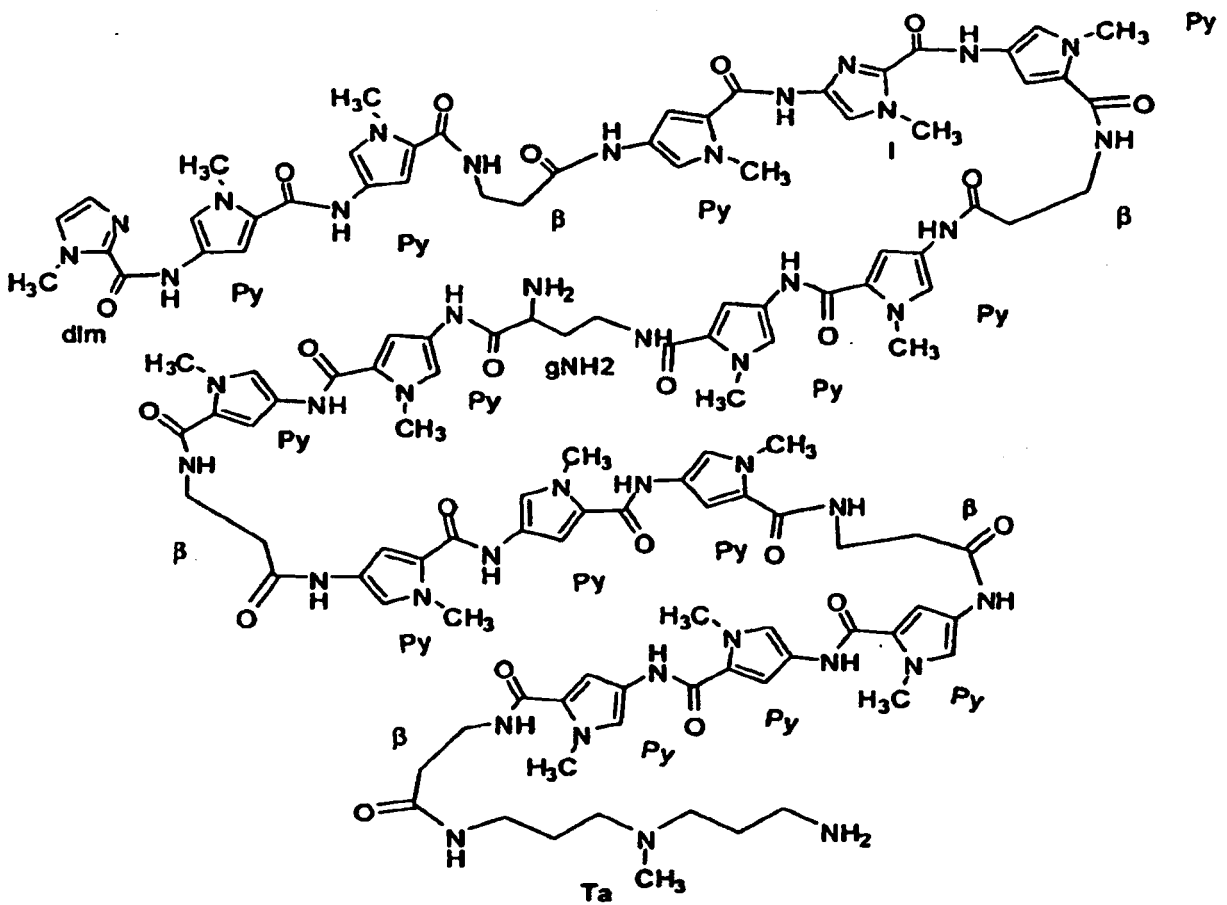


Figura 5



Im P P β P I P β P P γ (NH₂) P P β P P P β P P P β Ta;

Figura 6

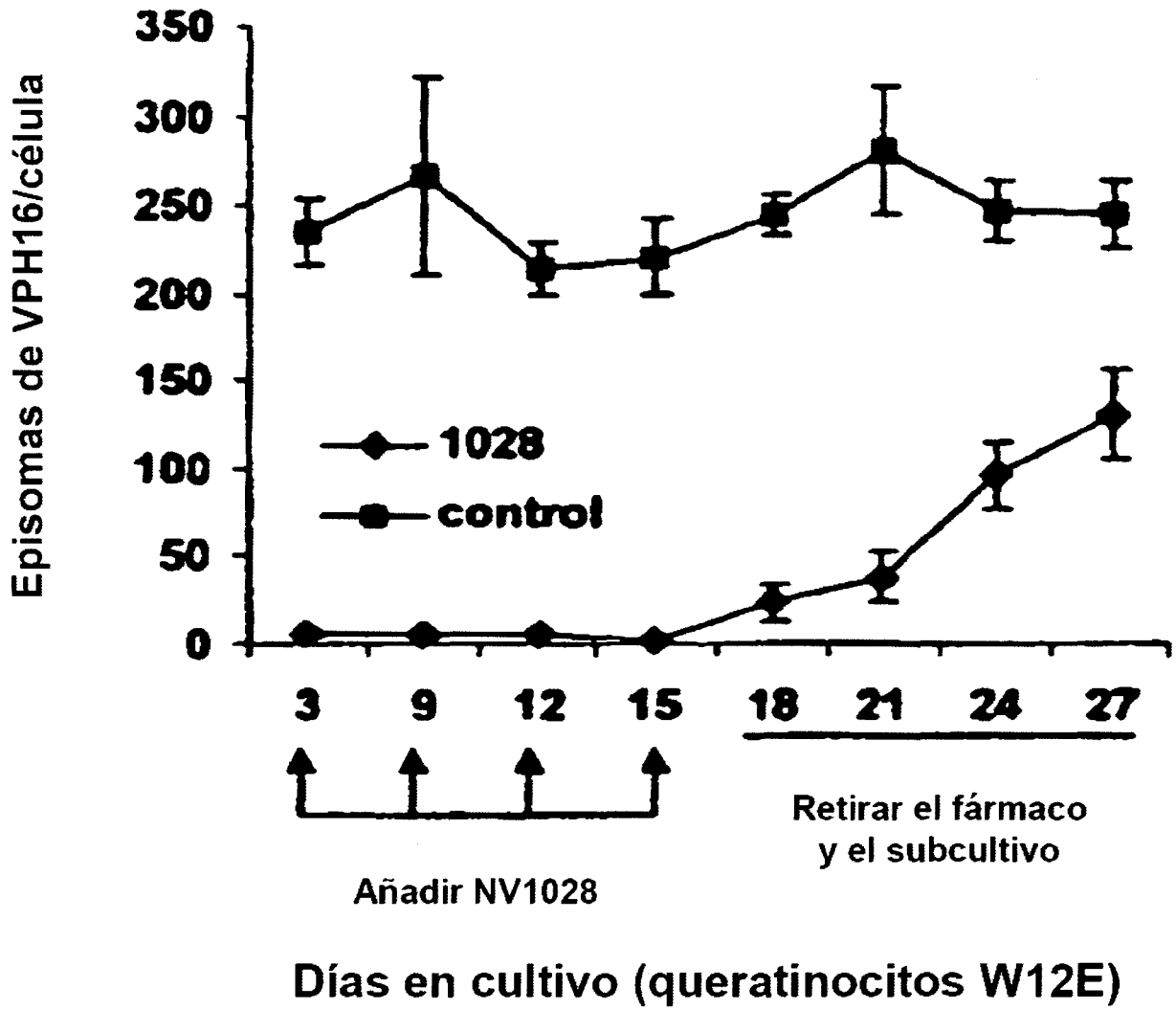


Figura 7

Motivos de enlace de poliamidas

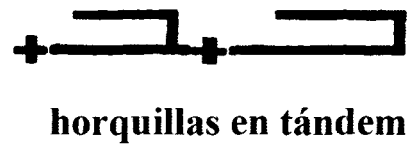
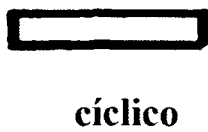
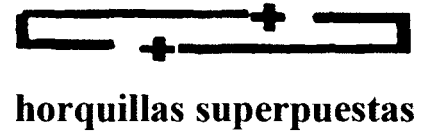
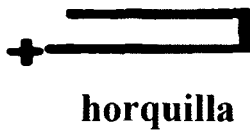
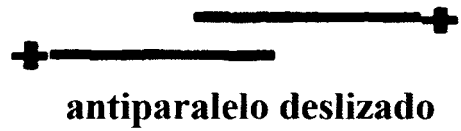
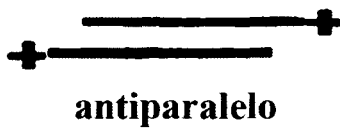


Figura 8