

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 597**

51 Int. Cl.:
C07D 417/04 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08757463 .8**
96 Fecha de presentación: **18.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2159224**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2010**

54 Título: **Tiazolil dihidropirimidinas sustituidas con bromo-fenilo**

30 Prioridad:
18.06.2007 CN 200710119019

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD (100.0%)
Northern Industrial Area Songshan Lake
Dongguan
Guangdong 523000, CN

72 Inventor/es:
SIEGFRIED, GOLDMANN;
LI, JING y
LIU, YISONG

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 597 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

Tiazolil dihidropirimidinas sustituidas con bromo-fenilo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una nueva tiazolil dihidropirimidina sustituida con bromo-fenilo, a su procedimiento de preparación y a su uso como un medicamento, especialmente para el tratamiento y la prevención de las infecciones por hepatitis B. La presente invención también se refiere a una composición que comprende la dihidropirimidina, otro agente antivírico y, cuando sea apropiado, un inmunomodulador y a un medicamento que comprende la composición especialmente para el tratamiento y la prevención de las infecciones por VHB tales como las infecciones por hepatitis B.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la hepatitis B pertenece a la familia de los hepadnavirus. Puede producir enfermedades crónicas agudas y/o persistentes o progresivas. Muchas otras manifestaciones clínicas del estado patológico también se producen por el virus de la hepatitis B - en particular la inflamación crónica del hígado, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Además, la coinfección con el virus de la hepatitis delta puede tener efectos adversos en el progreso de la enfermedad.

15 El interferón y la lamivudina son medicamentos convencionales aprobados para su uso para el tratamiento de la hepatitis crónica. Sin embargo, el interferón sólo tiene una actividad moderada pero tiene una reacción secundaria adversa. Aunque la lamivudina tiene una buena actividad, su resistencia se desarrolla rápidamente durante el tratamiento y a menudo los efectos de la recaída aparecen después de que haya finalizado el tratamiento. El valor de la CI_{50} de la lamivudina (3-TC) es 300 nM (Science, 299 (2003), 893-896).

20 La Patente de los Estados Unidos de América N° 7.074.784 desvela la 6-amidoalquildihidropirimidina y su uso en forma de un medicamento especialmente para el tratamiento y la prevención de la infección por hepatitis B.

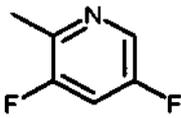
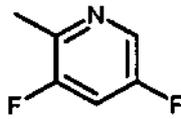
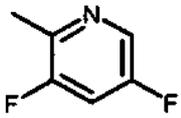
25 Se describe en el Ejemplo 12 de la Patente de los Estados Unidos de América N° 7.074.784 que R^1 es o-cloro, R^2 es p-cloro, R^6 es 3,5-difluoro-piridin-2-ilo, X es $-CH_2-$ y Z es morfolinilo. El compuesto puede inhibir el crecimiento del virus de la hepatitis B durante el cultivo celular. El valor de la CI_{50} es 2 nM (ensayado por ellos mismos).

La principal sustitución en el Ejemplo 12 es el reemplazo de bis-cloro con R^1 (o-bromo) y R^2 (p-flúor), que da como resultado que la CI_{50} del Compuesto 9 sea 7 nM (se ha descrito en el Ejemplo 9 de la patente). Y cuando los sustituyentes principales se cambian por R^1 (o-cloro) y R^2 (p-flúor), también se obtiene un valor de la CI_{50} aproximado ($CI_{50} = 2-4$ nM en el Ejemplo 5).

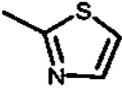
30 Se indica que el valor de la CI_{50} no puede aumentar con la variación de los sustituyentes principales R^1 y R^2 (véase la Tabla 1).

La Patente de los Estados Unidos de América N° 7.074.784 B2 también desvela un ejemplo, en el que un resto difluoro está sustituido con tiazol-2-il (se ha descrito en el Ejemplo 45 de la patente). El derivado tiene un valor de la CI_{50} similar (2 nM) (véase la Tabla 1).

35 Tabla 1. Ejemplo 2 de la Patente de los Estados Unidos de América N° 7.074.784 B2

Ejemplo	R^1	R^2	R^3	R^6	CI_{50} (nM)
12	Cl	Cl	CH ₃		2 (autoensayado)
9	Br	F	CH ₃		7
5	Cl	F	CH ₃		2-4

(continuación)

Ejemplo	R1	R2	R3	R6	Cl ₅₀ (nM)
45	Cl	Cl	CH ₃		2

Descripción detallada de la invención

- 5 Sorprendentemente hemos descubierto que se puede obtener un derivado con una actividad 10 veces superior y con el valor de la Cl₅₀ inferior a 1 nM por la sustitución con tiazol-2-ilo y cambiando los sustituyentes principales por R¹ = o-bromo y R² = p-flúor. Esto es inesperado cuando se lee la patente de los Estados Unidos de América N° 7.074.784 (véase la Tabla 2).

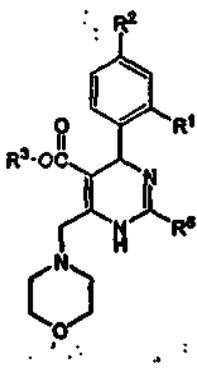
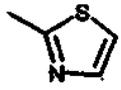
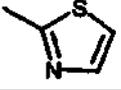
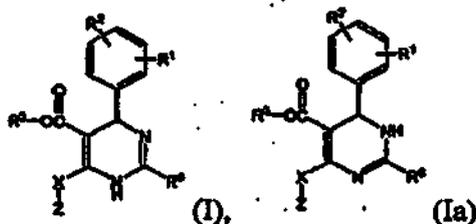


Tabla 2. Algunos Ejemplos de la presente Invención

Ejemplo	R ¹	R ²	R ³	R ⁶	Cl ₅₀ (nM)
6	Br	F	CH ₃		0,3
5	Br	F	CH ₂ CH ₃		0,2

- 10 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula (I) y a su isómero (Ia),



en las que R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es alquilo C₁-C₄, R⁶ es tiazol-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

Preferentemente, R¹ del compuesto de la presente invención que tiene las fórmulas (I) y (Ia) es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es metilo o etilo, R⁶ es tiazol-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

- 15 La presente invención también se refiere a un enantiómero del compuesto que se ha desvelado en el presente documento y a una mezcla del mismo. El racemato se puede separar por un procedimiento conocido y, fundamentalmente, es un componente homogéneo en una mezcla de estereoisómeros.

Los compuestos de la presente invención comprenden un isómero que tiene las fórmulas (I) y (Ia) y una mezcla de los mismos.

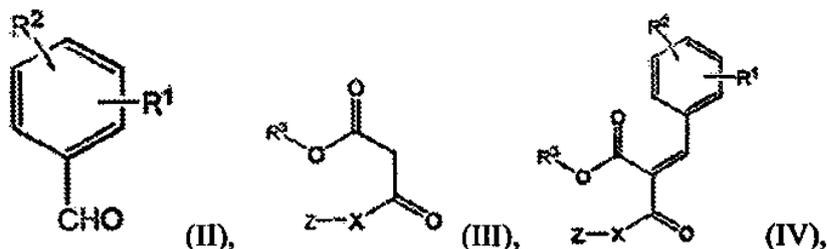
El compuesto de la presente invención también puede estar en una forma de una sal, preferentemente una sal fisiológicamente aceptable.

5 La sal fisiológicamente aceptable puede ser una sal de ácido inorgánico o una sal de ácido orgánico. Preferentemente es una sal de ácido inorgánico tal como cloruro, bromuro, fosfato o sulfato, etcétera, o un carboxilato o un sulfonato, tal como acetato, maleato, fumarato, malato, citrato, tartrato, lactato, benzoato o metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato o naftalenodisulfonato, etcétera.

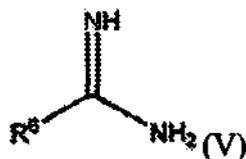
10 La sal fisiológicamente aceptable también puede ser una sal metálica o una sal de amonio del compuesto de la presente invención. En un ejemplo preferido, es una sal sódica, sal potásica, sal de magnesio o sal de calcio y una sal de amonio producida por amoníaco o por una amina orgánica tal como etilamina, dietilamina o trietilamina, dietanolamina o trietanolamina, diciclohexilamina, alcohol dimetilaminoetílico, arginina, lisina, etilendiamina ó 2-feniletilamina, etcétera.

El compuesto (I) de la presente invención se puede preparar por los procedimientos siguientes:

15 [A] en primer lugar un benzaldehído que tiene la fórmula (II) reacciona con un β -cetoéster que tiene la fórmula (III) con o sin la adición de una base o de un ácido y, cuando sea apropiado, en presencia de un disolvente orgánico inerte para producir un compuesto de bencilideno que tiene la fórmula (IV):



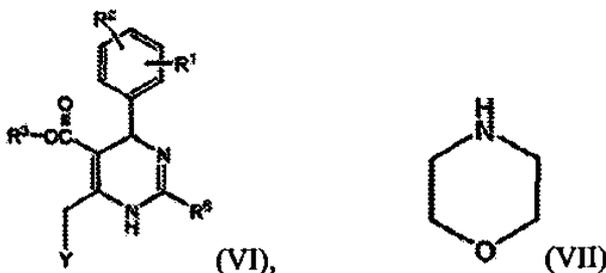
20 en la que R^1 , R^2 , R^3 , X y Z son como se han definido en el presente documento y después el compuesto de bencilideno reacciona con una amidina que tiene la fórmula (V) o una sal de la misma (tal como hidrocloreto o acetato) con o sin la adición de una base o de un ácido, y, cuando sea apropiado, en presencia de un disolvente orgánico inerte:



en la que R^6 es como se ha definido en el presente documento; o

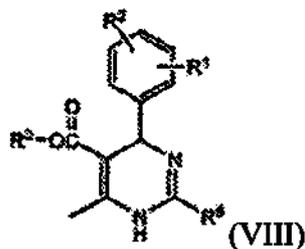
25 [B] el β -cetoéster que tiene la fórmula (III) reacciona con el benzaldehído que tiene la fórmula (II) y con la amidina que tiene la fórmula (V) o con una sal de la misma (tal como hidrocloreto o acetato) con o sin la adición de una base o un ácido y, cuando sea apropiado, en presencia de un disolvente orgánico inerte en una etapa; o

30 [C] si X en la fórmula (I) es metileno, un compuesto que tiene la fórmula (VI) reacciona con morfolina que tiene la fórmula (VII) con o sin la adición de una base, y, cuando sea apropiado, en presencia de un disolvente orgánico inerte,



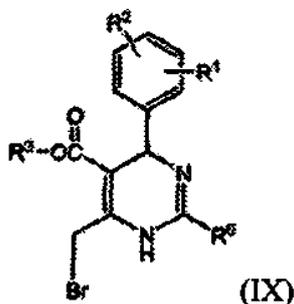
en el que R^1 , R^2 , R^3 y R^6 son como se han definido en el presente documento e Y es un sustituyente nucleófilo, tal como cloro, bromo, yodo, metilsulfonilo o toluenosulfonilo; o

El compuesto de fórmula (VI) se puede preparar, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto que tiene la fórmula (VIII)



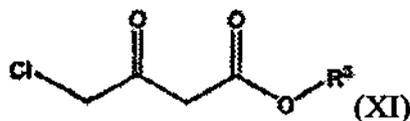
5

en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^6 son como se han definido en el presente documento, con un agente de bromación tal como N-bromosuccinimida, preferentemente en una disolución orgánica inerte, para producir un compuesto que tiene la fórmula (IX):



10 y haciendo reaccionar el compuesto que tiene un sustituyente nucleófilo, directamente o después de que el compuesto se haya convertido adicionalmente de acuerdo con un procedimiento convencional como se ha descrito en una bibliografía, con la morfolina que tiene la fórmula (VII).

15 Para preparar el compuesto de la presente invención que tiene la fórmula (I) en la que X es metileno y Z es morfolinilo se hace reaccionar un cloroacetato que tiene la fórmula (XI) con morfolina (VII) para producir el β -ceto carboxilato de fórmula (III),



en la que R^3 es como se ha definido en el presente documento.

Como un material de partida, el 2-bromo-4-fluoro-benzaldehído (II) está disponible en el mercado.

20 Como un material de partida, el β -ceto carboxilato (III) es bien conocido o se puede preparar mediante los procedimientos conocidos que se han publicado en la bibliografía [por ejemplo, D. Borrmann, "Umsetzung von Diketen mit Alkoholen, Phenolen und Mercaptanen", en "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), volumen VII/4, 230 en adelante (1968); Y. Oikawa, K. Sugano y O. Yonemitsu, J. Org. Chem. 43, 2087 (1978)].

El compuesto (V) es conocido y se puede preparar de acuerdo con las descripciones del documento WO-A-99/54326 y del documento WO-A-99/54329.

25 La morfolina (VII) está disponible en el mercado.

El compuesto (VIII) se puede preparar de acuerdo con las etapas [A] o [B] que se han descrito en el documento WO-A-99/54326.

Todos los disolventes orgánicos inertes son adecuados para su uso en las etapas A, B, y C. El disolvente orgánico es preferentemente un alcohol tal como metanol, etanol y alcohol isopropílico, un éter tal como dioxano, éter dietílico,

tetrahidrofurano, etilenglicol monometil éter, etilenglicol dimetil éter, un ácido carboxílico tal como ácido acético, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, piridina o triamida del ácido hexametilfosfórico.

5 La temperatura de la reacción se puede variar dentro de un intervalo bastante amplio. Normalmente la temperatura está entre 20 °C y 150 °C. Preferentemente, la temperatura es la temperatura de ebullición del disolvente seleccionado.

La reacción se puede llevar a cabo a presión atmosférica o a alta presión. Normalmente se lleva a cabo a la presión atmosférica.

La reacción se puede llevar a cabo con o sin un ácido o una base. Es preferente llevar a cabo la reacción en presencia de un ácido débil tal como ácido acético, ácido fórmico o similar.

10 Una realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende A) al menos una de las dihidropirimidinas que se han mencionado anteriormente y B) al menos uno de los agentes antivíricos distintos de A).

Una determinada realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende A) la dihidropirimidina que se ha mencionado anteriormente, B) un inhibidor de la polimerasa del VHB y, cuando sea apropiado, C) un inmunomodulador.

15 Preferentemente, el inmunomodulador C) se selecciona entre, por ejemplo, todos los interferones tales como α -interferón, β -interferón y γ -interferón, especialmente α -2a-interferón y α -2b-interferón, una interleucina tal como interleucina-2, un polipéptido tal como timosina- α -1 y un timoconano, un derivado de imidazoquinolina tal como levamisol, una inmunoglobulina y una vacuna terapéutica.

20 De ese modo, la presente invención también se refiere a una composición para el tratamiento y la prevención de las infecciones por el VHB y a su uso para el tratamiento de las enfermedades inducidas por el VHB.

El uso de de las combinaciones de la presente invención proporciona ventajas valiosas para el tratamiento de las enfermedades inducidas por el VHB en comparación con la monoterapia con los compuestos individuales, a saber, principalmente una actividad antivírica sinérgica, pero también una buena tolerancia de las combinaciones de la presente invención en Tox-50 (el intervalo de toxicidad en el que sobrevive el 50% de las células).

25 Las sustancias mencionadas como inhibidores B de la polimerasa del VHB para los fines de la presente invención son aquéllas que, en el ensayo de la polimerasa endógena que se publicó por Ph. A. Furman y col. en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volumen 36 (Nº 12), 2688 (1992) y que se ha descrito en lo sucesivo en el presente documento, conduce a una inhibición de la formación de un ADN bicatenario del VHB, dando como resultado un máximo del 50% de la actividad del valor cero.

30 Los inhibidores B de la polimerasa del VHB para su uso en la presente invención son las sustancias que se han desvelado en el experimento de la polimerasa endógena publicado en *"Antimicrobial Agents and Chemotherapy"* Volumen 36 (Nº 12), 2688 (1992) por Ph. A. Furman y las sustancias que se han descrito a continuación para la inhibición de la formación del ADN bicatenario del VHB dando como resultado de ese modo un valor máximo del 50% de la actividad para que sea cero.

35 Los viriones del VHB que proceden de los sobrenadantes del cultivo incorporan in vitro los nucleósidos 5'-trifosfato en la cadena positiva del ADN del VHB. Usando electroforesis en gel de agarosa, se observa la incorporación del [α -³²P]-desoxinucleósido 5'-trifosfato en el producto de ADN vírico de 3,2 kb en presencia y en ausencia de una sustancia que potencialmente tiene propiedades para la inhibición de la polimerasa del VHB. Los viriones del VHB se obtienen a partir del sobrenadante del cultivo celular de las células HepG2.2.15 por precipitación con polietilenglicol y se concentran.

40 Se mezcla una parte en volumen del sobrenadante del cultivo celular clarificado con 1/4 parte en volumen de una disolución acuosa que contiene un 50% en peso de polietilenglicol 8000 y de cloruro sódico 0,6 M. Los viriones se sedimentan por centrifugación a 2500 x g/15 minutos. Los sedimentos se vuelven a suspender en 2 ml de tampón que contiene tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) y se dializan frente al mismo tampón que contiene cloruro potásico 100 mM. Las muestras se pueden congelar a - 80 °C. Cada mezcla de reacción (100 μ l) contiene al menos

45 10⁵ viriones del VHB; tris-HCl 50 mM (pH 7,5); cloruro potásico 300 mM; cloruro de magnesio 50 mM; Nonident[®] P-40 al 0,1% (detergente no iónico de Boehringer Mannheim); dATP 10 μ M, dGTP 10 μ M, dTTP 10 μ M; 10 μ Ci [³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; concentración final 33 nM) y 1 μ M del inhibidor potencial de la polimerasa en su forma trifosforilada. Las muestras se incuban a 37 °C durante una hora y después se detiene la reacción mediante la adición de EDTA 50 mM. Se añade una disolución de SDS al 10% peso/volumen (que contiene 10 g de SDS por 90

50 ml de agua) hasta una concentración final del 1% en volumen (en base al volumen total) y se añade proteinasa K hasta una concentración final de 1 mg/ml. Después de una incubación a 37 °C durante una hora, las muestras se extraen con el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (relación en volumen 25:24:1) y el ADN se precipita de la fase acuosa con etanol. El sedimento de ADN se vuelve a suspender en 10 μ l de tampón en gel (disolución de 10,8 g de tris, 5,5 g de ácido bórico y 0,75 g de EDTA en 1 litro de agua (= tampón TBE)) y se separa por electroforesis en un gel de agarosa. El gel se seca o los ácidos nucleicos ahí presentes se transfieren a una membrana por la técnica de transferencia Southern. Después se determina la cantidad de ADN bicatenario formado y marcado en relación con el control negativo (= reacción de la endo-pol sin sustancia o con sustancia con control

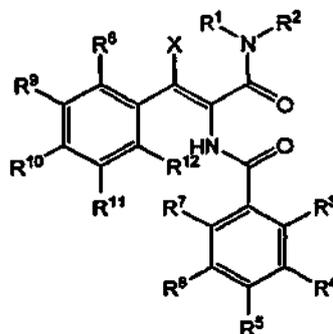
55

inactivo). Un inhibidor de la polimerasa del VHB está presente cuando existe como máximo un 50% de la actividad del control negativo.

Los inhibidores de la polimerasa del VHB preferidos B) comprenden, por ejemplo, 3TC = lamivudina = 4-amino-1-[(2R-cis)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-pirimidin-2(1H)-ona, véase el documento EP-B 382 526 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.047.407) y el documento WO 91/11186 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.204.466); Adefovir dipivoxilo = 9-[2-[[bis[(pivaloiloxi)-metoxi]-fosfinil]-metoxi]-etil]-adenina, véase el documento EP-B 481 214 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.663.159 y N° 5.792.756) y las Patentes de los Estados Unidos de América N° 4.724.233 y N° 4.808.716; BMS 200475 = [1S-(1- α ,3- α ,4- β)]-2-amino-1,9-dihidro-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilen-ciclopentil]-6H-purin-6-ona, véase el documento EP-B 481 754 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.206.244 y N° 5.340.816) y los documentos WO 98/09964 y 99/41275; Abacavir = (-)-(1S-cis)-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol, véase el documento EP-B 349 242 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.049.671) y el documento EP-B 434 450 (= Patente de los Estados Unidos de América N° 5.034.394); FTC = (2R-cis)-4-amino-5-fluoro-1-[2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-pirimidin-2(1H)-ona, véase el documento WO 92/14743 (= Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.204.466, N° 5.210.085, N° 5.539.116, N° 5.700.937, N° 5.728.575, N° 5.814.639, N° 5.827.727, N° 5.852.027, N° 5.892.025, N° 5.914.331, N° 5.914.400) y el documento WO92/18517; β -L-FDDC = 5-(6-amino-2-fluoro-9H-purin-9-il)-tetrahidro-2-furanmetanol, véase el documento WO 94/27616 (= Patentes de los Estados Unidos de América N° 5.627.160, N° 5.561.120, N° 5.631.239 y N° 5.830.881); L-FMAU = 1-(2-desoxi-2-fluoro- β -L-arabinofuranosil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona, véase el documento WO 99/05157, el documento WO 99/05158 y la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.753.789.

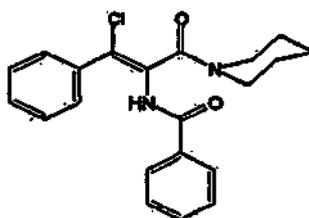
Una realización preferida adicional la presente invención se refiere a una composición que comprende A) las dihidropirimidinas que se han mencionado anteriormente que tienen las fórmulas (I) y (Ia); y B) lamivudina.

Otros agentes B antivíricos preferidos del VHB comprenden, por ejemplo, las fenilpropenamidas de la siguiente fórmula:



en la que R¹ y R² son, cada uno independientemente, alquilo C₁₋₄ ó, junto con el átomo de nitrógeno en el que están situados, forman un anillo que tiene de 5 a 6 átomos en el anillo que comprende carbono y/o oxígeno; de R³ a R¹² cada uno es independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, nitro, ciano o trifluorometilo; y R¹³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₄, acilo C₁₋₇ o aralquilo y X es halógeno o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido.

Las fenilpropenamidas y sus procedimientos de preparación se desvelan en el documento WO 98/33501 y se mencionan en éste para su publicación. AT-61 es el compuesto



Los inmunomoduladores C) preferidos comprenden, por ejemplo, todos los interferones tales como α , β y γ -interferones, en particular también los α -2a y α -2b-interferones, interleucinas tales como la interleucina-2, polipéptidos tales como timosina- α -1 y timoctonano, derivados de la línea imidazoquino tales como Levamisole®, inmunoglobulinas y vacunas terapéuticas.

Una realización adicional preferida de la presente invención se refiere a las combinaciones de A) las dihidropirimidinas que se han mencionado anteriormente (I) y (Ia), B) lamivudina y, cuando sea apropiado, C) un interferón.

Descripción de los Ensayos

- 5 La acción antivírica de los compuestos de la presente invención en el virus de la hepatitis B se investiga por procedimientos basados en aquéllos que se han descrito por M. A. Sells y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 1005-1009 (1987) y B. E. Korba y col., Antiviral Research 19, 55-70 (1992).

Los ensayos antivíricos se llevan a cabo en placas para microtitulación de 96 pocillos. La primera fila vertical de la placa sólo recibe el medio de crecimiento y las células HepG2.2.15. Sirve como control del virus.

- 10 Las disoluciones madre de los compuestos del ensayo (50 mM) se disuelven inicialmente en DMSO y se preparan adicionalmente diluciones en el medio de crecimiento de las HepG2.2.15. Los compuestos de acuerdo con la presente invención normalmente se pipetean en una concentración de ensayo de 100 μ M (1^a concentración del ensayo) en cada caso en la segunda fila vertical del ensayo de la placa para microtitulación y posteriormente se diluye en dos etapas dobles 210 veces en el medio de crecimiento más el 2% en peso de suero fetal bovino (volumen 25 μ l)

Cada pocillo de la placa para microtitulación después contiene 225 μ l de la suspensión de células de HepG2.2.15 (5 x 10⁴ células/ml) en el medio de crecimiento más el 2% en peso de suero fetal bovino. La mezcla del ensayo se incuba a 37 °C y con CO₂ al 5% (v/v) durante 4 días.

- 20 El sobrenadante después se aspira y se desecha y los pocillos reciben 225 μ l de medio de crecimiento recién preparado. Cada uno de los compuestos de acuerdo con la presente invención se añade de nuevo en forma de una disolución concentrada 10 veces en un volumen de 25 μ l. Las mezclas se incuban durante un periodo adicional de 4 días.

- 25 Antes de la cosecha de los sobrenadantes para determinar el efecto antivírico, se examinan las células HepG2.2.15 con el microscopio óptico o por medio de los procedimientos bioquímicos de detección (por ejemplo por tinción con Azul de Alamar o por tinción con Azul de Tripano) para las alteraciones citotóxicas.

El sobrenadante y/o las células después se cosechan y se aspiran por medio de vacío sobre cámaras de transferencia puntual de 96 pocillos recubiertas con una membrana de nylon (de acuerdo con la información del fabricante).

Determinación de la Citotoxicidad

- 30 Las alteraciones citotóxicas o citostáticas inducidas por sustancias en las células HepG2.2.15 se detectan, por ejemplo, con el microscopio óptico en forma de alteraciones en la morfología celular. Tales alteraciones inducidas por sustancias en las células HepG2.2.15 en comparación con las células sin tratar son visibles, por ejemplo, en forma de citólisis, vacuolización o morfología celular alterada. Una citotoxicidad del 50% (Tox.-50) significa que el 50% de las células muestra una morfología comparable con el correspondiente control celular.

- 35 La tolerabilidad de algunos de los compuestos de acuerdo con la presente invención se ensaya adicionalmente en otras células huésped tales como, por ejemplo, células HeLa, células sanguíneas periféricas primarias humanas o líneas celulares transformadas tales como las células H-9.

Las alteraciones citotóxicas no se detectan en concentraciones > 10 μ M de los compuestos de la presente invención.

Determinación de la Acción Antivírica

- 40 Después de transferir los sobrenadantes o las células lisadas a la membrana de nylon del aparato de transferencia (véase anteriormente), los sobrenadantes intra o extracelulares de las células HepG2.2.15 se desnaturalizan (NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 N), se neutralizan (NaCl 3 M/Tris HCl 0,5M, pH 7,5) y se lavan (2 x SSC). El ADN se cuece después sobre la membrana por incubación de los filtros a 120 °C durante 2-4 horas.

Hibridación del ADN

- 45 La detección del ADN vírico a partir de las células HepG2.2.15 tratadas en los filtros de nylon normalmente se lleva a cabo con sondas de ADN no radioactivas específicas para la hepatitis B marcadas con digoxigenina, cada una de las cuales se marca con digoxigenina, se purifican y se emplean para la hibridación de acuerdo con la información del fabricante.

- 50 La hibridación previa y la hibridación se llevan a cabo en 5 x SSC, 1 x reactivo de bloqueo, 0,1% en peso de N-lauroil-sarcosina, 0,02% en peso de SDS y 100 μ g de ADN de esperma de arenque. La hibridación previa se lleva a cabo a 60 °C durante 30 minutos y la hibridación específica se lleva a cabo con 20 a 40 ng/ml del ADN específico del VHB desnaturalizado y digoxigenizado (14 horas, 60 °C). Después se lavan los filtros.

Detección del ADN del VHB mediante los Anticuerpos Digoxigenina

La detección inmunológica del ADN marcado con digoxigenina se lleva a cabo de acuerdo con la información del fabricante:

5 Los filtros se lavaron y se hibridaron previamente en un reactivo de bloqueo (de acuerdo con la información del fabricante). La hibridación después se llevó a cabo con un anticuerpo anti-DIG acoplado con fosfatasa alcalina durante 30 minutos. Después de una etapa de lavado, el sustrato de la fosfatasa alcalina, CSPD, se añadió, se incubó con los filtros durante 5 minutos, después se envolvió en una película de plástico y se incubó a 37 °C durante un periodo adicional de 15 minutos. La quimioluminiscencia de las señales del ADN específico de la hepatitis B se visualizaron por la exposición de los filtros a una película de rayos X (incubación dependiendo de la intensidad de la señal: de 10 minutos a 2 horas).

10 La concentración inhibidora media máxima (CI_{50} , concentración inhibidora del 50%) se determinó como la concentración en la que la banda específica de la hepatitis B intra o extracelular se redujo en el compuesto de acuerdo con la presente invención en un 50% en comparación con una muestra no tratada.

15 Es inesperado que el compuesto de la presente invención presente un efecto antivírico eficaz con una CI_{50} inferior a 1 nM. Por tanto, el compuesto de la presente invención es adecuado para su uso en el tratamiento de las enfermedades inducidas por virus, especialmente las infecciones persistentes por VHB agudas y crónicas. Las enfermedades víricas crónicas inducidas por VHB pueden empeorar la morbilidad y la infección crónica por el virus de la hepatitis B puede producir en algunos casos cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

20 Las áreas de indicación que se pueden mencionar para los compuestos de la presente invención son, por ejemplo: el tratamiento de las infecciones víricas agudas y crónicas que pueden conducir a la hepatitis infecciosa, por ejemplo, las infecciones con los virus de la hepatitis B. Los compuestos de la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento de las infecciones crónicas por la hepatitis B y el tratamiento de las infecciones víricas crónicas por la hepatitis B aguda y crónica.

25 La presente invención incluye preparaciones farmacéuticas que, además de los vehículos inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados, comprenden uno o más compuestos (I) o (Ia) o una combinación de la presente invención o que consisten en uno o más principios activos (I) o (Ia) o en una combinación de la presente invención.

Se pretende que los principios activos (I) y (Ia) estén presentes en las preparaciones farmacéuticas que se han mencionado anteriormente en una concentración de aproximadamente el 0,1 al 99,5% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5 al 95% en peso, respecto a la mezcla total.

30 Las preparaciones farmacéuticas que se han mencionado anteriormente pueden comprender también otros principios farmacéuticamente activos aparte de los compuestos (I) y (Ia).

La relación de las cantidades de los componentes A, B y, cuando sea apropiado, C en las composiciones de la presente invención puede variar dentro de unos límites amplios; preferentemente es de 5 a 500 mg de A/10 a 1000 mg de B, en particular de 10 a 200 mg de A/20 a 400 mg de B.

35 El componente C, que también se va a usar cuando sea apropiado, se puede usar en cantidades, preferentemente, de 1 a 10 millones, en particular de 2 a 7 millones, U.I. (unidades internacionales), aproximadamente tres veces a la semana durante un periodo de hasta un año.

40 Se pretende que los compuestos o las composiciones de la presente invención estén presentes en las preparaciones farmacéuticas que se han mencionado anteriormente en general en una concentración de aproximadamente 0,1 a 99,5, preferentemente aproximadamente de 0,5 a 95, % en peso de la mezcla total.

Las preparaciones farmacéuticas que se han mencionado anteriormente se pueden producir de una manera convencional mediante los procedimientos conocidos, por ejemplo mezclando el principio o los principios activos con el vehículo o los vehículos.

45 Generalmente la administración del principio o de los principios activos ha resultado ser ventajosa en los medicamentos tanto humanos como veterinarios en cantidades totales de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 500, preferentemente de 1 a 100 mg/kg de peso corporal cada 24 horas, cuando sea apropiado en forma de una pluralidad de dosis únicas, para conseguir los resultados deseados. Una mono dosis contiene el principio o los principios activos preferentemente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 80, en particular de 1 a 30 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, puede ser necesario desviarse de las dosificaciones que se han mencionado, en particular dependiendo de las especies y del peso corporal del sujeto a tratar, la naturaleza y la gravedad del trastorno, el tipo de preparación y el modo de administración del medicamento y el tiempo o el intervalo en el que tiene lugar la administración.

La presente invención por tanto se refiere adicionalmente a los compuestos y a las composiciones que se han definido anteriormente para el control de las enfermedades.

La presente invención se refiere adicionalmente a medicamentos que comprenden al menos uno de los compuestos o de las composiciones que se han definido anteriormente y, cuando sea apropiado, a uno o varios otros principios farmacéuticamente activos.

- 5 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de los compuestos y de las composiciones que se han definido anteriormente para la producción de un medicamento para el tratamiento y la profilaxis de las enfermedades que se han descrito anteriormente, preferentemente de las enfermedades víricas, en particular de la hepatitis B.

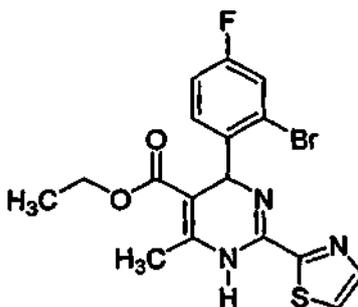
Los datos de porcentaje en los siguientes ejemplos se refieren en cada caso al peso a menos que se indique lo contrario. Las relaciones de los disolventes en las mezclas de disolventes se basan en cada caso en el volumen.

Ejemplos

10 A. Preparación de Intermedios

Intermedio 1

Éster etílico del ácido 4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-6-metil-1,4-dihidropirimidin-5-carboxílico



- 15 Una mezcla de 10,0 g (49,3 mmol) de 2-bromo-4-fluorobenzaldehído, 6,4 g (49,3 mmol) de acetoacetato de etilo, 8,1 g (49,3 mmol) de hidrocloreto de 2-amidino-tiazol y 4,8 g (58,5 mmol) de acetato sódico se disolvió o se suspendió en 400 ml de etanol y después se llevó a ebullición y se calentó a reflujo durante 16 horas. La disolución obtenida se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El residuo se lavó con agua para retirar las sales inorgánicas. Se obtuvo el producto de 10,8 g (51,6%). Punto de fusión: 163-165 °C.

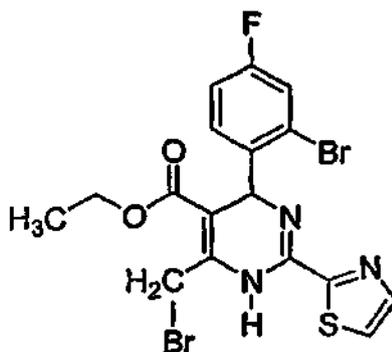
Intermedio 2

- 20 Éster metílico del ácido 4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-6-metil-1,4-dihidropirimidin-5-carboxílico

El producto Intermedio 2 se sintetizó a partir de acetoacetato de metilo mediante un procedimiento similar al del Intermedio 1. Rendimiento: 53% (punto de fusión: 155-157 °C).

Intermedio 3

Éster etílico del ácido 6-bromometil-4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-1,4-dihidropirimidin-5-carboxílico



- 25 Se añadieron 5,0 g (11,8 mmol) del producto Intermedio 1 en 100 ml de tetracloruro de carbono y se calentó a 50 °C en una atmósfera de gas argón para obtener una disolución transparente. A esta temperatura, se añadieron 2,33 g (13,0 mmol) de N-bromosuccinimida en la disolución y se mezcló a la temperatura durante 10 minutos. Después, la

disolución obtenida se enfrió inmediatamente y se filtró a temperatura ambiente y se descomprimió para su concentración. El producto obtenido tiene una pureza superior al 90% de acuerdo con el resultado del ensayo por HPLC y se usó en forma de un material de partida en la siguiente etapa. Rf = 0,69 (la relación éter de petróleo a acetato de etilo es 8:2).

5 Intermedio 4

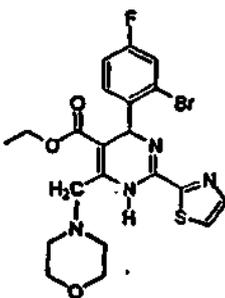
Éster metílico del ácido 6-bromometil-4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-1,4-dihidropirimidina-5-carboxílico

El producto Intermedio 4 se sintetizó a partir del producto Intermedio 2 mediante un procedimiento similar al de la preparación del producto Intermedio 3. Rf = 0,69 (la relación éter de petróleo a acetato de etilo es 8:2).

B. Preparaciones de los Ejemplos

10 Ejemplo 5

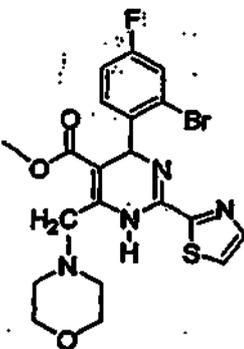
Éster etílico del ácido 4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-6-(4-morfolinilmetil)-1,4-dihidropirimidina-5-carboxílico



15 Se añadieron 2,0 g del producto Intermedio 3 en 15 ml de metanol para formar una disolución. La disolución se mezcló con 5 partes de morfolina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La disolución obtenida después se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Rendimiento: 1,7 g. Punto de fusión: 161-163 °C. Rf = 0,45 (la relación éter de petróleo a acetato de etilo es 8:2)

Ejemplo 6

Éster metílico del ácido 4-(2-bromo-4-fluorofenil)-2-(tiazol-2-il)-6-(4-morfolinilmetil)-1,4-dihidropirimidina-5-carboxílico



20 Se sintetizó el Ejemplo 6 a partir del producto Intermedio 4 mediante un procedimiento similar al de la preparación del Ejemplo 5. Punto de fusión: 173-175 °C. Rf = 0,43 (la relación éter de petróleo a acetato de etilo es 8:2).

Los enantiómeros preparados en el Ejemplo 5 y en el Ejemplo 6 se separaron en una columna quiral (Chiralpak AS-H de Daicel, fase móvil: n-hexano/etanol = 99/1).

25 Los compuestos activos anti-VHB en los dos ejemplos son enantiómeros que tienen un tiempo de retención relativamente largo.

Los datos de la actividad de los compuestos de la presente invención se enumeran a continuación:

Ejemplo N°	CI ₅₀ (nM)
5	0,2
(-)-5	0,1
6	0,3
(-)-6	0,2

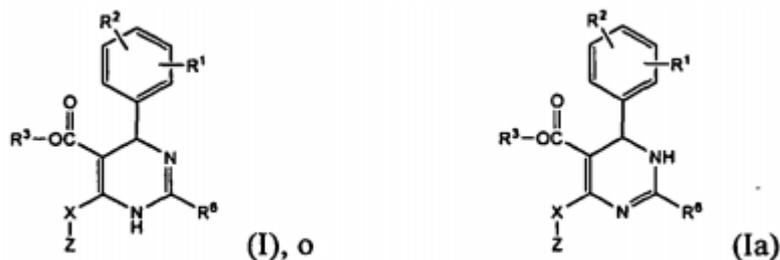
El tratamiento de las células HepG2.2.15 que producen el virus de la hepatitis B con los compuestos de la presente invención puede conducir a una reducción del ADN vírico intra y/o extracelular.

Aplicabilidad Industrial

- 5 Los ejemplos que se han desvelado en el presente documento muestran que los compuestos que se han desvelado en el presente documento presentan un efecto antivírico eficaz con la CI₅₀ inferior a 1 nM. Por tanto, los compuestos se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad inducida por virus, especialmente las infecciones por VHB persistente agudas y crónicas.

REIVINDICACIONES

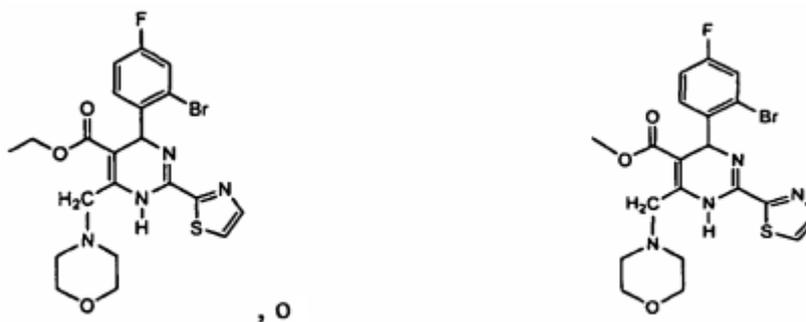
1. Un compuesto que tiene la fórmula (I) o su isómero (Ia)



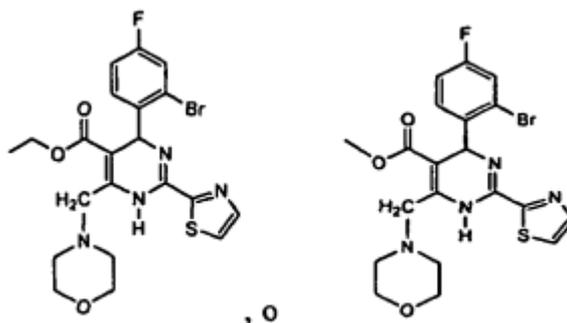
5 o un enantiómero o una sal del mismo, en las que R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es un alquilo C₁-C₄, R⁶ es tiazolil-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 ó el enantiómero o la sal del mismo, en el que R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es metilo o etilo, R⁶ es tiazolil-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

3. Un compuesto que tiene una de las siguientes estructuras o un enantiómero, tautómero o sal del mismo:



10 4. Un compuesto que tiene una de las siguientes estructuras o un isómero levo, tautómero o sal del mismo:



5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó el enantiómero o la sal del mismo, en el que la sal es una sal de ácido inorgánico o una sal de ácido orgánico.

15 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 ó el enantiómero o la sal del mismo, en el que la sal del ácido inorgánico es una sal del ácido clorhídrico, una sal del ácido bromhídrico, una sal del ácido fosfórico o una sal del ácido sulfúrico.

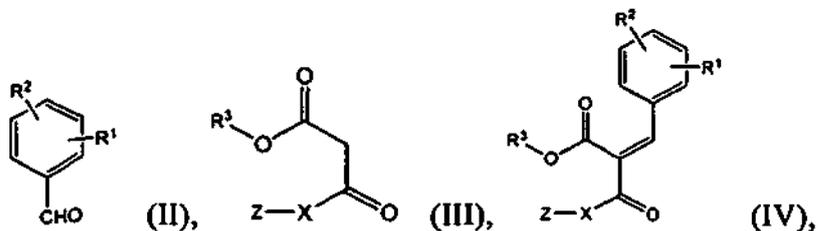
7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó el enantiómero o la sal del mismo, en el que la sal del ácido orgánico es un carboxilato o un sulfonato.

20 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 ó el enantiómero o la sal del mismo, en el que el carboxilato es acetato, maleato, fumarato, malato, citrato, tartrato, lactato o benzoato.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 o el enantiómero o la sal del mismo, en el que el sulfonato es metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato o naftalenodisulfonato.

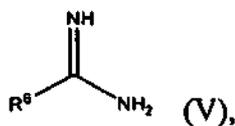
10. Un procedimiento para la preparación del compuesto de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento :

5 (a) hacer reaccionar un benzaldehído que tiene la fórmula (II) con un β-cetoéster que tiene la fórmula (III) para producir un compuesto de bencilideno que tiene la fórmula (IV):



y

(b) hacer reaccionar el compuesto de bencilideno que tiene la fórmula (IV) con una amidina que tiene la fórmula (V):



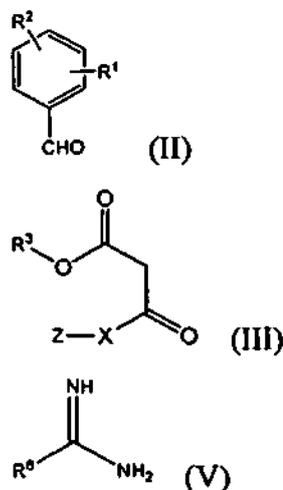
10

o una sal del mismo

en la que R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es un alquilo C₁-C₄, R⁶ es tiazolil-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

11. Un procedimiento para la preparación del compuesto de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un compuesto que tiene la fórmula (III) con un aldehído (II) y una amidina (V) o una sal de la misma en una etapa;

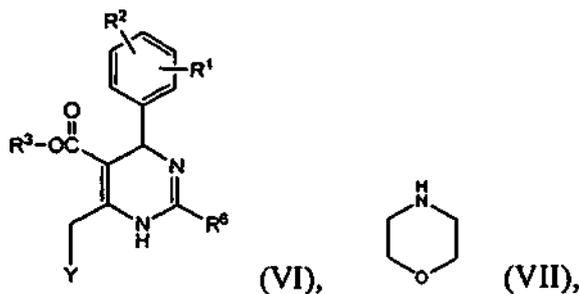
15



en las que R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es un alquilo C₁-C₄, R⁶ es tiazolil-2-ilo, X es metileno y Z es morfolinilo.

12. Un procedimiento para la preparación del compuesto de la reivindicación 1, en el que X de fórmula (I) es metileno y el procedimiento se **caracteriza por** hacer reaccionar el compuesto que tiene la fórmula (VI) con morfolina (VII) o una sal de la misma:

20

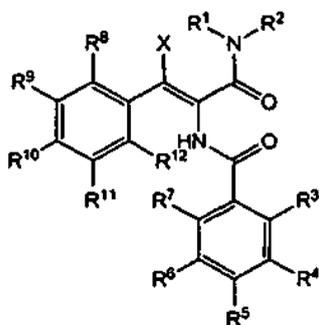


en la que Y es cloro, bromo, yodo, metilsulfonilo o toluenosulfonilo, y R¹ es o-bromo, R² es p-flúor, R³ es un alquilo C₁-C₄, y R⁶ es tiazolil-2-ilo.

13. Una composición que comprende los siguientes componentes:

- 5 A) al menos un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
 B) al menos un agente antivírico que es distinto del componente A; y, cuando sea apropiado,
 C) al menos un inmunomodulador seleccionado entre un interferón, una interleucina, un polipéptido, un derivado de imidazoquinolina, una inmunoglobulina o una vacuna terapéutica.

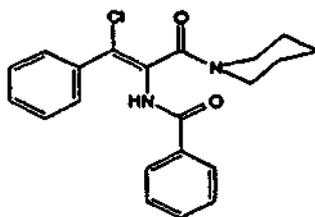
10 14. La composición de la reivindicación 13, en la que el componente B es un inhibidor de la polimerasa del VHB, lamivudina o un compuesto de fenilpropenamida que tiene la siguiente fórmula:



o una sal del mismo, en la que

- 15 X es halógeno o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;
 cada uno de R¹ y R² es independientemente alquilo C₁₋₄ ó, junto con el átomo de nitrógeno en el que están situados, forman un anillo que tiene de 5 a 6 átomos en el anillo que comprende carbono y/o oxígeno; y
 cada uno de R³ a R¹² es independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ opcionalmente sustituido, nitro, ciano o trifluorometilo.

15. La composición de la reivindicación 14, en la que el componente B es el compuesto de fenilpropenamida que tiene la siguiente estructura:



- 20 16. Un medicamento que comprende al menos un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 ó al menos una composición de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, y, cuando sea apropiado, uno o más agentes farmacéuticamente activos.

17. Uso del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 ó de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de una enfermedad vírica, infección por hepatitis B o una enfermedad producida por la infección por la hepatitis B.

5 18. El uso de la reivindicación 17, en la que el medicamento es para el tratamiento y la prevención de la enfermedad producida por la infección por la hepatitis B que se selecciona entre hepatitis, cirrosis o carcinoma hepatocelular.

19. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 ó al menos una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, y, cuando sea apropiado, un vehículo farmacéuticamente aceptable.