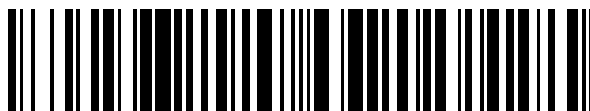


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 922**

51 Int. Cl.:

C07F 9/572 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007** **E 07838974 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 2078029**

54 Título: **Fosfoindoles enantiómeramente puros como inhibidores del HIV**

30 Prioridad:

29.09.2006 US 848584 P

09.11.2006 US 857980 P

23.02.2007 US 903115 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2014

73 Titular/es:

IDENIX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
320 Bent Street, Floor 4
Cambridge, MA 02141, US

72 Inventor/es:

STORER, RICHARD;
ALEXANDRE, FRANCOIS-RENE;
DOUSSON, CYRIL;
MOUSSA, ADEL M. y
BRIDGES, EDWARD

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 488 922 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

Fosfoindoles enantiómeramente puros como inhibidores del HIV

Campo de la invención

- 5 En la presente memoria se proporcionan compuestos fosfoindólicos enantiómeramente puros útiles para inhibir la replicación viral. Específicamente, en la presente memoria se proporcionan compuestos fosfoindólicos S puros para inhibir la replicación viral. Además, se proporcionan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y los compuestos para el uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de una infección por HIV.

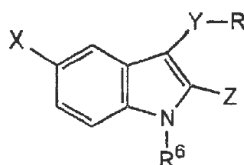
Antecedentes de la invención

- 10 Se sabe en la especialidad que los indoles, los nucleósidos y sus análogos tienen utilidad en el tratamiento de infecciones virales en mamíferos, incluyendo seres humanos. Virus que infectan mamíferos y se pueden tratar mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden indoles, nucleósidos o sus análogos o derivados incluyen, pero no se limitan a, hepatitis B incluyendo HCV, virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés), pestivirus tales como virus de la diarrea viral bovina (BVDV, por sus siglas en inglés), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, por sus siglas en inglés, también conocido como virus de la cólera porcina) y virus de la enfermedad de Border de las ovejas (BDV), y flavivirus como virus de la fiebre hemorrágica del dengue (DHF o DENV, por sus siglas en inglés), virus de la fiebre del heno (YFV, por sus siglas en inglés), virus del Nilo occidental (WNV), virus del síndrome del choque y la encefalitis japonesa (Moennig et al., Adv. Vir. Res. 1992, 41:53-98; Meyers, G. and Thiel, H.-J., Adv. In Viral Res., 1996, 47:53-118; Moennig et al., Adv. Vir. Res. 1992, 41:53-98; S.B. Halstead, Rev. Infect. Dis., **1984**, 6:251-64; S.B. Halstead, Science, **1988**, 239:476-81; T.P. Monath, New Engl. J. Med., **1988**, 319:641-3).

Indoles

Ciertos análogos y derivados indólicos se han usado para tratar la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

- 25 Por ejemplo, Williams et al. muestra indoles sustituidos para el tratamiento de la infección por HIV en la Patente de EE. UU. Nº 5.527.819 de Merck. Los compuestos divulgados en la patente '819 comprenden una gran clase representada genéricamente por la siguiente Fórmula estructural amplia:



- 30 en las que las variables X, Y, Z, R y R⁶ se definen ampliamente para abarcar aproximadamente cien compuestos. En la mayoría de los ejemplos mostrados, Y es SO₂, Z es -C(O)NH₂ y R un fenilo opcionalmente sustituido.

La Patente de EE. UU. Nº 5.124.327 de Greenlee et al. y cedida a Merck & Co. divulga una clase de compuestos sulfonilfenilindólicos opcionalmente sustituidos. Supuestamente, estos compuestos son activos como inhibidores de transcriptasa inversa y por lo tanto útiles en el tratamiento de la infección por HIV y el sida.

- 35 La Patente de EE. UU. Nº 6.710.068 de Idenix Pharmaceuticals, Ltd., divulga una clase de fenilindoles que están sustituidos con al menos dos restos distintos de hidrógeno bien en el anillo fenílico o bien en el anillo bencílico de la función indólica, o en ambos anillos. Los sustituyentes generalmente están contenidos en las posiciones 3" y 5" si están situados en el anillo fenílico, y en las posiciones 4' y 5', 5' y 6' o 5' y 7' si están situados en el anillo bencílico del resto indólico. Véase además la Publicación PCT nº WO 02/083126.

- 40 La Publicación PCT nº WO 2004/014364 de Idenix Pharmaceuticals divulga otra clase más de fenilindoles que presentan una actividad anti-HIV mejorada. Como sus predecesores, estos compuestos están sustituidos con al menos dos restos distintos de hidrógeno bien en el anillo fenílico o bien el anillo benzo de la funcionalidad indólica, o en ambos anillos. Además, estos compuestos incorporan un número de sustituyentes que tienen una funcionalidad carboxamida en la posición 2 del grupo indol del compuesto, la posición mostrada en la Fórmula anterior como "Z".

- 45 Idenix Pharmaceuticals divulgó otra clase más de compuestos fenilindólicos, siendo éstos fosfofenilindoles, que son útiles en el tratamiento del HIV y/o el sida (documentos US 2006/0074054 y WO 06/054182).

Bristol Myers Squibb es el cesionario de numerosas patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones PCT que divulgan diversos indoles, azaindoles, piperacinas y pirrolidinas opcionalmente sustituidos para el tratamiento del HIV y/o el sida. Véanse la Publicación de EE. UU. nº 2004/0006090 de Kadow et al.; la Publicación de EE. UU. nº 2004/0063746 de Regueiro-Ren et al.; la Publicación de EE. UU. nº. 2003/0096825 de Wang et al.; la Publicación

de EE. UU. n° 2003/0236277 de Kadow et al.; y el documento WO 03/068221 de Kadow et al.

El documento WO 01/02388 de SmithKline Beecham S.P.A divulga fenilindoles opcionalmente sustituidos con un sustituyente carbamilo que tienen utilidad en el tratamiento del HIV, el sida, la osteoporosis, cánceres y la enfermedad de Alzheimer.

5 Warner-Lambert Company divulga diversos indolliacepinonas, oxacepinonas, diacepinonas, benzotiofenos, benzofuranos e indol-2-carboxamidas para el tratamiento del HIV. (Véanse el documento U.S. 5.424.329 de Boschelli et al., el documento U.S. 5.565.446 de Boschelli et al., el documento U.S. 5.703.069 de Connor et al. y el documento WO 96/29077 de Warner-Lambert Company).

10 Shinogi & Co. divulgan derivados indólicos opcionalmente sustituidos que son inhibidores de integrasas virales útiles como fármacos anti-HIV (Publicación de EE. UU. n° 2002/0019434 de Fujishita et al., Patente de EE. UU. N° 6.716.605 de Fujishita et al. y Patente de EE. UU. N° 6.506.787 de Fujishita et al.)

15 La Patente de EE. UU. N° 5.945.440 de Kleinschroth et al. divulga una clase de indolocarbazolamidas para el tratamiento de una variedad de enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades virales (incluyendo HIV), enfermedades cardíacas y vasculares, enfermedades broncopulmonares, trastornos inflamatorios, enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y otras enfermedades.

Gunasekera et al. en la Patente de EE. UU. N° 4.866.084 enseña ciertos compuestos de alcaloide bisindólico que tienen actividad antiviral y antitumoral, incluyendo HSV (virus del herpes simple, por sus siglas en inglés). La Patente de EE. UU. 5.935.982 de Dykstra et al. presenta una clase diferente de bisindoles que tienen utilidad específica frente a infecciones retrovirales y especialmente HIV.

20 Matsunaga et al., en la Patente de EE. UU. N° 5.852.011 (22 de diciembre de 1998), divulga una clase de derivados indólicos sustituidos con una función heteroarilo y una función amida. Se dice que los compuestos generalmente poseen propiedades antitumorales, antivirales y antimicrobianas.

Dykstra et al., en la Patente de EE. UU. N° 5.935.982, divulga una clase de bisindoles y específicamente proponen su uso para tratar infecciones retrovirales, y especialmente la infección por HIV.

25 Domagala et al., en la Patente de EE. UU. N° 5.929.114 (27 de julio de 1999), divulga una clase de compuestos de arilitio y bitiobisarilamida, incluyendo un derivado indólico, que según se dice tienen actividad antibacteriana y antiviral.

Pearce et al., en la Patente de EE. UU. N° 5.830.894 (3 de noviembre de 1998), divulga una clase de derivados triacinoindólicos que se dice que tienen actividad contra pestivirus, lo más notablemente actividad para BVDV.

30 Se han usado indoles en el tratamiento de enfermedades distintas al HIV. La Patente de EE. UU. N° 5.981.525 de Farina et al. divulga un grupo complejo de indoles para el uso en el tratamiento de la osteoporosis basado en su capacidad para inhibir H⁺-ATPasa de osteoclastos y así reducir la reabsorción ósea. La Patente de EE. UU. N° 6.025.390, también de Farina et al., enseña otro grupo de derivados indólicos, denominados derivados de ácido pentadienoico heteroaromáticos, que también son útiles en el tratamiento de la osteoporosis. La Patente de EE. UU. N° 5.489.685 de Houpi et al. divulga una serie de compuestos que son ésteres de ácido furo(2,3-b)piridincarboxílico, cuya utilidad es el tratamiento del HIV.

A la luz del hecho de que las infecciones por HIV han alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo y tienen efectos trágicos sobre el huésped infectado, sigue habiendo una fuerte necesidad de proporcionar agentes farmacéuticos nuevos y eficaces para tratar infecciones virales con baja toxicidad para el huésped.

40 Un objetivo de la invención es proporcionar compuestos, métodos de uso y composiciones para el tratamiento de un huésped infectado con HIV o para el tratamiento de síntomas relacionados con el sida.

Compendio de la invención

45 Según esto, se proporcionan en la presente memoria compuestos enantiómeramente puros para el tratamiento o la prevención de una infección viral, por ejemplo, una infección por HIV en un huésped que lo necesite. Se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y los compuestos para el uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis. También se describen métodos para preparar los compuestos.

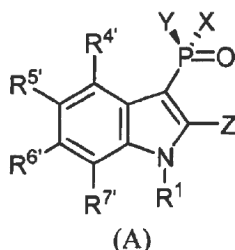
50 Según se demuestra en los ejemplos posteriores, mucha de la actividad de los compuestos fosfoindólicos quirales reside en un enantiómero o estereoisómero. Además, ciertos compuestos proporcionados en la presente memoria son inhibidores potentes y selectivos de HIV resistente a inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos naturales (NNRTI, por sus siglas en inglés) in vitro. Ciertos compuestos proporcionados en la presente memoria pueden proporcionar una barrera genética superior para el desarrollo de resistencia a HIV cuando se comparan con terapias actuales tales como efavirenz.

Se proporcionan en la presente memoria compuestos S-fosfoindólicos puros y su uso en métodos para el

tratamiento o la prevención de una infección viral tal como una infección por HIV en un huésped que lo necesite.

Específicamente, la presente invención se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y sus usos definidos en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria compuestos fosfoindólicos puros según la fórmula (A), o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



en donde, p. ej.:

X es hidrógeno; arilo o heterociclo, que puede estar sustituido o no sustituido y que puede comprender una estructura bicíclica, tricíclica o de tipo espiro; alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ o alquilo;

- 10 Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR;

Z es OR, NHR, NRR, carboxamido, amido, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

R¹ es hidrógeno, acilo, S(O)_n-R, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

cada uno de R^{4'}, R, R^{6'} y R^{7'} es independientemente hidrógeno, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, arilo, heterociclo, halógeno, CN, CF₃, OR, NHR, NRR o NO₂;

- 15 n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, arilo o heterociclo.

En ciertas realizaciones, según la fórmula (A), X es arilo o heterociclo; alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ o alquilo; e Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR.

- 20 En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria compuestos fosfoindólicos puros según la fórmula (B), o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto proporcionado en la presente memoria y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

- 25 En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un compuesto o una composición farmacéutica proporcionados en la presente memoria para el uso en métodos para tratar o prevenir una infección por HIV.

En otro aspecto, los métodos comprenden administrar oralmente un compuesto proporcionado en la presente memoria para terapia o para tratamiento. Según se muestra en los ejemplos posteriores, ciertos compuestos proporcionados en la presente memoria están biodisponibles oralmente con farmacocinética favorable.

- 30 En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria compuestos para el uso en métodos para inhibir un citocromo P450. Según se muestra en los ejemplos posteriores, ciertos compuestos descritos en la presente memoria son eficaces para inhibir uno o más citocromos P450 incluyendo citocromo P450 3A4, citocromo P450 2C8 y citocromo P450 2C9. Según esto, se proporcionan en la presente memoria los compuestos proporcionados en la presente memoria para el uso en métodos para inhibir un citocromo P450. Los métodos comprenden la etapa de poner en contacto un citocromo P450 con una cantidad de un compuesto proporcionado en la presente memoria
- 35 eficaz para inhibir el citocromo P450.

- 40 En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria compuestos para el uso en métodos para modular la farmacocinética de un fármaco que es metabolizado por un citocromo P450. Los métodos comprenden la etapa de administrar el fármaco en combinación o alternancia con un compuesto proporcionado en la presente memoria. El fármaco puede ser cualquier molécula farmacéuticamente aceptable conocida por los expertos en la especialidad por ser metabolizada por un citocromo P450. En ciertas realizaciones el citocromo P450 es citocromo P450 3A4, citocromo P450 2C8 o citocromo P450 2C9.

Los compuestos proporcionados en la presente memoria se pueden administrar solos o en combinación o alternancia con uno o más de otros agentes antivirales. Los compuestos o sus composiciones también se pueden usar profilácticamente para prevenir o retardar el avance de una dolencia clínica en individuos portadores de un anticuerpo anti-HIV, que son positivos a antígeno de HIV o que han sido expuestos a un virus HIV.

- 5 En otro aspecto, se proporcionan composiciones y compuestos para el uso en métodos para el tratamiento de un huésped coinfectado con HIV y hepatitis B, que comprenden administrar un compuesto puro proporcionado en la presente memoria en combinación con uno o más agentes eficaces para el tratamiento de una infección por hepatitis B. En otro aspecto, se proporcionan composiciones y compuestos para el uso en métodos para el tratamiento de un huésped coinfectado con HIV y hepatitis C, que comprende administrar un compuesto puro proporcionado en la presente memoria en combinación con uno o más agentes eficaces para el tratamiento de una infección por hepatitis C.

- 10 También se describen procedimientos para la preparación de los compuestos descritos en la presente memoria, incluyendo compuestos fosfoindólicos enantiómeramente puros, compuestos fosfoindólicos S puros, compuestos fosfoindólicos R puros, compuestos puros según la fórmula (A) que se indica posteriormente y compuestos puros según la fórmula (B) que se indica posteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una estructura cristalina de transcriptasa inversa de HIV K103N/Y181C con el compuesto 3-fosfoindólico de Fórmula I.

- 20 La Figura 1B muestra un esquema de la estructura cristalina de transcriptasa inversa de HIV K103N/Y181C con el compuesto 3-fosfoindólico de Fórmula I.

La Figura 2A muestra una estructura cristalina de una molécula del Compuesto III.

La Figura 2B muestra una estructura cristalina de una molécula del Compuesto III.

Descripción detallada de la invención

- 25 Se proporcionan "composiciones de materia", composiciones farmacéuticas y compuestos para el uso en métodos para el tratamiento de infecciones por virus, particularmente infecciones por HIV, en mamíferos. En particular, se proporcionan compuestos 3-fosfoindólicos puros, composiciones que comprenden estos compuestos y los compuestos y las composiciones para el uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de una infección incluyendo una infección por HIV en un huésped. Además, se describen en la presente memoria procedimientos para la preparación de 3-fosfoindoles puros.

Definiciones

- 30 Según se usa en la presente memoria, el término "puro", cuando se aplica a un compuesto quiral, se refiere a un enantiómero del compuesto quiral sustancialmente libre de su enantiómero opuesto (es decir, en exceso enantiómero). Por ejemplo, la forma "R" pura de un compuesto está sustancialmente libre de la forma "S" del compuesto y está, así, en exceso enantiómero de la forma "S". El término "enantiómeramente puro" o "enantiómero puro" indica que el compuesto comprende un exceso de un enantiómero, p. ej. más de 75% en peso, más de 80% en peso, más de 85% en peso, más de 90% en peso, más de 91% en peso, más de 92% en peso, más de 93% en peso, más de 94% en peso, más de 95% en peso, más de 96% en peso, más de 97% en peso, más de 98% en peso, más de 98,5% en peso, más de 99% en peso, más de 99,2% en peso, más de 99,5% en peso, más de 99,6% en peso, más de 99,7% en peso, más de 99,8% en peso o más de 99,9% en peso, del enantiómero. En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total del compuesto, es decir todos los enantiómeros del compuesto. En ciertas realizaciones, un enantiómero puede estar en exceso en 30-80%, o en 30-70%, 30-60%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% o 60%, o cualquier porcentaje intermedio.

- 45 Según se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "fosfoindol (S) enantiómeramente puro" o "fosfoindol (S)" se refiere, p. ej., a al menos aproximadamente 80% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 20% en peso de fosfoindol (R), al menos aproximadamente 90% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 10% en peso de fosfoindol (R), al menos aproximadamente 95% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 5% en peso de fosfoindol (R), al menos aproximadamente 99% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 1% en peso de fosfoindol (R) o al menos aproximadamente 99,9% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 0,1% en peso de fosfoindol (R). En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total del compuesto, es decir ambos o todos los enantiómeros del compuesto.

- 50 Según se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "fosfoindol (R) enantiómeramente puro" se refiere, p. ej., a al menos aproximadamente 80% en peso de fosfoindol (R) y como mucho aproximadamente 20% en peso de fosfoindol (S), al menos aproximadamente 90% en peso de fosfoindol (R) y como mucho aproximadamente 10% en peso de fosfoindol (S), al menos aproximadamente 95% en peso de

fosfoindol (R) y como mucho aproximadamente 5% en peso de fosfoindol (S), al menos aproximadamente 99% en peso de fosfoindol (R) y como mucho aproximadamente 1% en peso de fosfoindol (S), al menos aproximadamente 99,9% en peso de fosfoindol (R) o como mucho aproximadamente 0,1% en peso de fosfoindol (S). En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total de fosfoindol, es decir, ambos o todos los enantiómeros del fosfoindol.

En las composiciones proporcionadas en la presente memoria, fosfoindol enantiómeramente puro o una de sus sales farmacéuticamente aceptables puede estar presente con otros ingredientes activos o inactivos. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende fosfoindol (S) enantiómeramente puro puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 90% de excipiente y aproximadamente 10% de fosfoindol (S) enantiómeramente puro. En ciertas realizaciones, el fosfoindol (S) enantiómeramente puro en tales composiciones puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 99,9% en peso de fosfoindol (S) y como mucho aproximadamente 0,1% en peso de fosfoindol (R). En ciertas realizaciones, el ingrediente activo se puede formular con poco o ningún vehículo, excipiente o diluyente.

Siempre que se haga referencia a un intervalo en la presente memoria, incluye independientemente y separadamente cualquier miembro del intervalo. Como un ejemplo no limitativo, se considera que el término "alquilo C₁-C₁₀" incluye, independientemente, cualquier miembro del grupo, tal que, por ejemplo, alquilo C₁-C₁₀ incluye funcionalidades alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ y C₁₀ lineales, ramificadas y, cuando sea apropiado, cíclicas. De forma similar, como otro ejemplo no limitativo, 1-10% incluye independientemente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%, así como intervalos intermedios tales como 1-2%, 2-3%, etc.

El término "quiral" según se usa en la presente memoria incluye un compuesto que tiene la propiedad de que no es superponible a su imagen especular.

El término "aislado" incluye una composición que incluye al menos 85 o 90% en peso, 95%, 98%, 99% o 100% en peso, del compuesto.

El término "alquilo", según se usa en la presente memoria, a menos que se especifique otra cosa, incluye un hidrocarburo primario, secundario o terciario lineal, ramificado o cíclico saturado típicamente de C₁₋₁₀, y específicamente incluye, pero no se limita a, metilo, CF₃, CCl₃, CFCl₂, CF₂Cl, etilo, CH₂CF₃, CF₂CF₃, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos, y particularmente incluye grupos alquilo halogenados y aún más particularmente grupos alquilo fluorados. Ejemplos no limitativos de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquilo se seleccionan del grupo que consiste en halógeno (fluoro, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, bien desprotegidos o bien protegidos según sea necesario, como saben los expertos en la especialidad, por ejemplo, según se enseña por Greene et al., Protected Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 2ª Ed., 1991.

El término "alquilo inferior", según se usa en la presente memoria y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un grupo alquilo lineal, ramificado o, si es apropiado, cíclico (por ejemplo ciclopropilo) saturado C₁₋₆, incluyendo restos tanto sustituidos como no sustituidos.

Los términos "alquilamino" o "arilamino" se refieren a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente. A menos que se indique específicamente otra cosa en esta solicitud, cuando el alquilo es un resto adecuado, entonces es un alquilo inferior, ya sea sustituido o no sustituido.

Según se usa en la presente memoria, el término "nitro" significa -NO₂; el término "sulfhidrido" significa -SH y el término "sulfonilo" significa -SO₂.

Los términos "alquenilo" y "alquinilo" incluye restos alquilo, incluyendo formas tanto sustituidas como no sustituidas en las que al menos un enlace C-C saturado se reemplaza por un doble o triple enlace. Así, el alquenilo C₂₋₆ puede ser vinilo, alilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo o 5-hexenilo. De forma similar, el alquinilo C₂₋₆ puede ser etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo o 5-hexinilo.

El término "alquilenilo" incluye un radical alquilo divalente, de cadena lineal, saturado, de la fórmula -(CH₂)_n-, en la que "n" puede ser cualquier número entero de 1 a 10.

"Alquilo", "alcoxi", "alquenilo", "alquinilo", etc., incluye grupos tanto de cadena lineal como ramificados. sin embargo, una referencia a un radical individual tal como "propilo" abarca solo ese radical de cadena ramificada, mientras que un isómero de cadena ramificada, tal como "isopropilo", se menciona específicamente así.

El término "protegido", según se usa en la presente memoria y a menos que se defina de otro modo, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo para evitar su reacción adicional o con otros propósitos. Una gran variedad de grupos protectores de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo es conocida para los

expertos en la especialidad de la síntesis orgánica.

El término "arilo", según se usa en la presente memoria y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a cualquier anillo de carbonos monocíclico, bicíclico o tricíclico estable de hasta 8 miembros en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático según se define por la regla de $4n+2$ de Huckel, y especialmente fenilo, bifenilo o naftilo. El término incluye restos tanto sustituidos como no sustituidos. El grupo arilo puede estar sustituido con cualquier resto descrito, incluyendo pero no limitado a uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en halógeno (fluoro, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, azido, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, bien protegido o bien desprotegido según sea necesario, como saben los expertos en la especialidad, por ejemplo, como se enseña en Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 3ª Ed., 1999.

El término "alcarilo" o "alquilarilo" se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente arilo o un grupo alquilo conectado a la molécula a través de un grupo arilo según se definió en la presente memoria. El término "aralquilo" o "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo sustituido con un sustituyente alquilo o conectado a la molécula a través de un grupo alquilo según se definió anteriormente.

El término "cicloalquilo" incluye un anillo de C_{3-8} , incluyendo, pero no limitado a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "alcoxi" significa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene un radical oxígeno unido, teniendo el grupo alquilo el número de carbonos especificado o cualquier número dentro de este intervalo. Por ejemplo, un "-O-alquilo", alcoxi C_{1-4} , metoxi, etc.

El término "halo" según se usa en la presente memoria se refiere a cualquier miembro de la familia de los halógenos. Se incluyen específicamente fluoro, cloro, bromo y yodo.

El término "acilo" o "éster conectado por O" incluye un grupo de la fórmula $C(O)R'$, en la que R' es un alquilo (incluyendo alquilo inferior) lineal, ramificado o cíclico, un residuo carboxilato de un aminoácido, arilo incluyendo fenilo, heteroarilo, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo; o alquilo (incluyendo alquilo inferior) sustituido, arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con cloro, bromo, fluoro, yodo, alquilo C_1 a C_4 o alcoxi C_1 a C_4 , ésteres de sulfonato tales como alquil- o aralquil-sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el éster de mono-, di- o tri-fosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. En realizaciones no limitativas, los grupos acilo incluyen acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, ciclopropilcarboxi, propionilo, butirilo, isobutirilo, hexanoilo, heptanoilooctanoilo, neo-heptanoilo, fenilacetilo, 2-acetoxi-2-fenilacetilo, difenilacetilo, α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetilo, bromoacetilo, 2-nitrobencenoacetilo, 4-clorobencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoroacetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, metoxiacetilo, 2-tiofenoacetilo, clorosulfonilacetilo, 3-metoxifenilacetilo, fenoxiacetilo, terc-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloroacetilo, dicloroacetilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, perfluoroheptanoilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, 7-clorododecafluoroheptanoilo, 7-clorododecafluoroheptanoilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, nonafluoro-3,6-dioxaheptanoilo, nonafluoro-3,6-dioxaheptanoilo, perfluoroheptanoilo, metoxibenzoilo, metil-3-amino-5-feniltiofeno-2-carboxilo, 3,6-dicloro-2-metoxibenzoilo, 4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)-benzoilo, 2-bromopropionilo, ω -aminocaprililo, decanoilo, n-pentadecanoilo, estearilo, 3-ciclopentilpropionilo, 1-bencenocarboxilo, O-acetilmandelilo, pivaloilacetilo, 1-adamantanocarboxilo, ciclohexanocarboxilo, 2,6-piridindicarboxilo, ciclopropanocarboxilo, ciclobutanocarboxilo, perfluorociclohexilcarboxilo, 4-metilbenzoilo, clorometilisoxazolilcarbonilo, perfluorociclohexilcarboxilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 1-pirrolidinocarbonilo, 4-fenilbenzoilo.

El término "acilamino" incluye un grupo que tiene una estructura de $-N(R')-C(=O)-R''$, en la que cada R' es independientemente como se definió anteriormente.

El término "carbonilo" incluye un grupo de la estructura $-C(=O)-X-R''$ o $X-C(=O)-R''$, donde X es O, S o un enlace y cada R es independientemente como se definió anteriormente.

El término "heteroátomo" incluye un átomo distinto de carbono o hidrógeno en la estructura de un compuesto heterocíclico, ejemplos no limitativos del cual son nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo o boro.

El término "heterociclo" o "heterocíclico", según se usa en la presente memoria excepto cuando se apunte, incluye un anillo monocíclico estable de 5 a 7 miembros o heterocíclico bicíclico estable de 8 a 11 miembros que es bien saturado o bien insaturado, incluyendo heteroarilo, y que consiste en un átomo o átomos de carbono y de uno a cuatro heteroátomos incluyendo pero no limitados a O, S, N y P; y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre opcionalmente pueden estar oxidados, y/o el heteroátomo de nitrógeno cuaternizado, e incluyendo cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos identificados anteriormente esté condensado a un anillo bencénico. El anillo heterocíclico puede estar unido en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable. El anillo heteroaromático puede estar parcialmente o totalmente hidrogenado, según se desee. Por ejemplo, se puede usar dihidropiridina en lugar de piridina. Los grupos

funcionales oxígeno y nitrógeno en un heteroarilo se pueden proteger según sea necesario o se desee. Grupos protectores adecuados para oxígeno o nitrógeno incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, tritilo, tritilo sustituido, alquilo, metanosulfonilo, p-toluenosulfonilo, o grupos acilo tales como acetilo y propionilo.

- 5 Ejemplos no limitativos de grupos heteroarilo y heterocíclicos incluyen furilo, piridilo, pirimidilo, piridacnilo, piracnilo, piperidinilo, piperacnilo, tienilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, imidazolilo, tetrazolilo, triazolilo, triacnilo, tiacnilo, oxazolilo, purinilo, carbazolilo, quinolinilo, pirazolilo, morfolinilo, bencimidazolilo, y similares. Cualquiera de los restos heteroaromáticos y heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos según se describió anteriormente para el arilo, incluyendo una sustitución o sustituciones con uno o más hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, alquilo, heterociclilo, halo, carboxi, acilo, aciloxi, amido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, bien protegidos o bien desprotegidos según sea necesario, como saben los expertos en la especialidad y como se enseña, por ejemplo, en Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Tercera Ed., **1999**.

- 15 El término "amino", según se usa en la presente memoria a menos que se especifique otra cosa, incluye un resto representado por la estructura " $-NR_2$ ", e incluye aminas primarias, secundarias y terciarias opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, arilo, heterociclilo y/o sulfonilo. Así, R_2 puede representar dos átomos de hidrógeno, dos restos alquilo o un hidrógeno y un resto alquilo.

- 20 El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" incluye α -, β -, γ - o δ -aminoácidos naturales y sintéticos, e incluye, pero no se limita a, aminoácidos encontrados en proteínas, es decir glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización, el aminoácido está en la configuración L, pero también se puede usar en la configuración D. Alternativamente, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo. Cuando se usa el término aminoácido, se considera que es una divulgación específica e independiente de cada uno de los ésteres de α -, β -, γ -o δ -glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina en las configuraciones D y L.

- 30 El término "amido" según se usa en la presente memoria incluye un carbonilo sustituido con amino, mientras que el término "amidino" significa un grupo que tiene la estructura " $-C(=NH)-NH_2$ ".

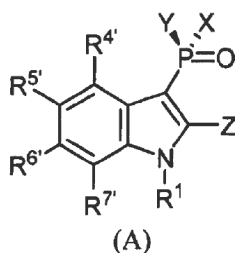
- 35 Ciertos términos que contienen azufre y fósforo tienen los siguientes significados estructurales: "sulfonato" incluye un grupo de la estructura " $-S(=O)(=O)-OR$ "; "sulfato" incluye un grupo de la estructura " $O-S(=O)(=O)-OR$ "; "sulfonamida" incluye un grupo de la estructura " $N(R')-S(=O)(=O)-R$ "; "sulfamoilo" incluye un grupo de la estructura " $-S(=O)(=O)-N(R')(R')$ "; "fosforilo" incluye un grupo de la estructura " $-P(=O)-OR$ "; y "fosforoamidato" incluye un grupo de la estructura " $Q-P(NR_1R_2)(=O)-OR$ ", donde cada R' es independientemente como se definió anteriormente.

- 40 El término "huésped", según se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que se puede replicar el virus, incluyendo líneas celulares y animales y, en ciertos casos, un ser humano. Alternativamente, el huésped puede ser portador de una parte del genoma viral del HIV, cuya replicación o función puede ser alterada por los compuestos de la presente invención. El término huésped se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con la totalidad o parte del genoma de HIV y animales, en particular, primates (incluyendo chimpancés) y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones en animales de la presente invención, el huésped es un paciente humano. Sin embargo, las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, están claramente abarcadas por realizaciones de la presente invención (tales como chimpancés).

- 45 El término "sustituido" incluye múltiples grados de sustitución con uno o más sustituyentes nombrados tales como, por ejemplo, halo, hidroxilo, tio, alquilo, alquenilo, alquinilo, nitro, ciano, azido, amino, carboxamido, etc. Cuando existen múltiples posibilidades de sustituyentes, el compuesto puede estar sustituido con uno o más de los grupos sustituyentes divulgados o reivindicados, independientemente entre sí, y considerarse individualmente o pluralmente.

Compuestos

Se describen en la presente memoria compuestos puros según la fórmula (A), o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



en donde, p. ej. :

X es hidrógeno; arilo o heterociclo, que puede estar sustituido o no sustituido y que puede comprender una estructura bicíclica, tricíclica o de tipo espiro; alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ o alquilo;

5 Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR;

Z es OR, NHR, NRR, carboxamido, amido, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

R¹ es hidrógeno, acilo, S(O)_n-R, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

cada uno de R^{4'}, R^{5'}, R^{6'} y R^{7'} es independientemente hidrógeno, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, arilo, heterociclo, halógeno, CN, CF₃, OR, NHR, NRR o NO₂;

10 n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, arilo o heterociclo.

Se describen compuestos según la fórmula (A) en la que X es arilo o heterociclo; alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ o alquilo; e Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR.

15 Se describen compuestos según la fórmula (A) en la que R^{4'} y R^{5'} son independientemente hidrógeno o halógeno y X, Y, Z, R¹, R^{6'}, R^{7'} y R son como se definieron anteriormente.

Se describen compuestos según la fórmula (A) en la que: cada uno de R^{4'} y R^{5'} es independientemente hidrógeno o halógeno;

R^{6'} y R^{7'} son hidrógeno;

R¹ es hidrógeno o S(O)_n-R;

20 Y es hidrógeno, R o O-R;

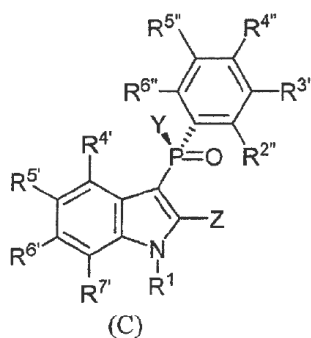
X es arilo opcionalmente sustituido;

Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

25 Se describen en la presente memoria compuestos puros según la fórmula (C) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



en donde Rfosfoindol (R), R^{3''}, R^{4''}, R^{5''} y R^{6''} son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, o alquenilo C₂₋₆;

$R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

R^1 es hidrógeno o $S(O)_n-R$;

Y es hidrógeno, R o O-R;

5 Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

Se describen compuestos de fórmula (C), en la que:

10 $R^{3''}$ y $R^{5''}$ son independientemente alquilo o alqueniilo C_{2-6} , cada uno de los cuales puede estar sustituido independientemente por CN o halógeno;

$R^{2''}$, $R^{4''}$ y $R^{6''}$ son hidrógeno;

cada uno de $R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

R^1 es hidrógeno o $S(O)_n-R$;

15 Y es hidrógeno, R u O-R;

Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

Se describen compuestos según la fórmula (C), en la que:

20 $R^{3''}$ y $R^{5''}$ son independientemente alquilo o alqueniilo C_{2-6} , cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido independientemente con CN o halógeno;

$R^{2''}$, $R^{4''}$ y $R^{6''}$ son hidrógeno;

cada uno de $R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

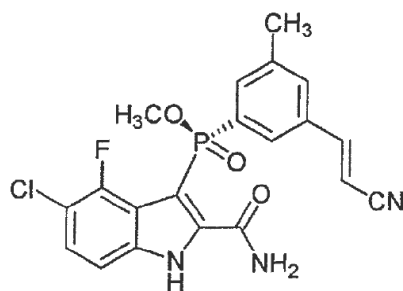
25 R^1 es hidrógeno;

Y es O-R;

Z es amido, carboxilo o carbonilo; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

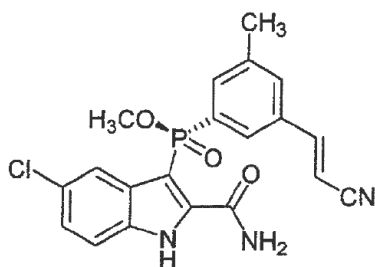
30 Se describe un compuesto puro, o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



(I)

en donde la configuración absoluta en el átomo de fósforo es R. El nombre químico del Compuesto I es éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-4-fluoro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico, y la fórmula empírica es $C_{20}H_{16}ClFN_3O_3P$ con un peso molecular de 431,39.

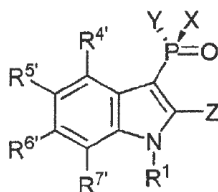
La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (III) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



(III)

en donde la configuración absoluta en el átomo de fósforo es R. El nombre químico del Compuesto III es éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico, y la fórmula empírica es $C_{20}H_{17}ClN_3O_3P$ con un peso molecular de 413,79.

Se describen en la presente memoria compuestos puros según la fórmula (B) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



(B)

en donde, p. ej.:

X es hidrógeno; arilo o heterociclo, que puede estar sustituido o no sustituido y que puede comprender una estructura bicíclica, tricíclica o de tipo espiro; alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} o alquilo;

Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR;

Z es OR, NHR, NRR, carboxamido, amido, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

R^1 es hidrógeno, acilo, $S(O)_n-R$, carboxilo, carbonilo o un residuo de aminoácido;

cada uno de $R^{4'}$, $R^{5'}$, $R^{6'}$ y $R^{7'}$ es independientemente hidrógeno, alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , arilo, heterociclo, halógeno, CN, CF_3 , OR, NHR, NRR o NO_2 ;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , arilo o heterociclo.

Se describen compuestos según la fórmula (B), en la que X es hidrógeno; arilo o heterociclo; alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} o alquilo; e Y es hidrógeno, R, O-R, NH-R o NRR.

Se describen compuestos según la fórmula (B), en la que $R^{4'}$ y $R^{5'}$ son independientemente hidrógeno o halógeno y X, Y, Z, R^1 , $R^{6'}$, $R^{7'}$ y R son como se definieron anteriormente.

Se describen compuestos según la fórmula (B), en la que:

$R^{4'}$ y $R^{5'}$ son cada uno independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

R^1 es hidrógeno o $S(O)_n-R$;

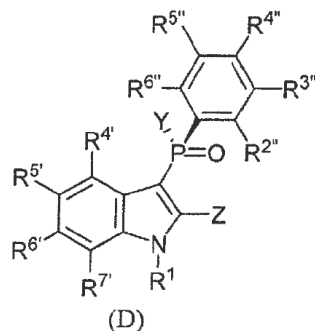
Y es hidrógeno, R o O-R;

Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

- 5 Se describen en la presente memoria compuestos puros según la fórmula (D) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



en donde $R^{2''}$, $R^{3''}$, $R^{4''}$, $R^{5''}$ y $R^{6''}$ son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo o alquenilo C_{2-6} ;

$R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

- 10 R^1 es hidrógeno o $S(O)_n-R$;

Y es hidrógeno, R o O-R;

Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

- 15 Se describen compuestos de fórmula (D), en la que:

$R^{3''}$ y $R^{5''}$ son independientemente alquilo o alquenilo C_{2-6} que opcionalmente puede estar sustituido con CN o halógeno;

$R^{2''}$, $R^{4''}$ y $R^{6''}$ son hidrógeno;

cada uno de $R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

- 20 $R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

R^1 es hidrógeno o $S(O)_n-R$;

Y es hidrógeno, R o O-R;

Z es carboxamido, amido, carboxilo o carbonilo;

n es 0, 1 o 2; y

- 25 cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

Se describen compuestos de fórmula (D), en la que:

$R^{3''}$ y $R^{5''}$ son independientemente alquilo o alquenilo C_{2-6} que opcionalmente pueden estar sustituido con CN o halógeno;

$R^{2''}$, $R^{4''}$ y $R^{6''}$ son hidrógeno;

- 30 cada uno de $R^{4'}$ y $R^{5'}$ es independientemente hidrógeno o halógeno;

$R^{6'}$ y $R^{7'}$ son hidrógeno;

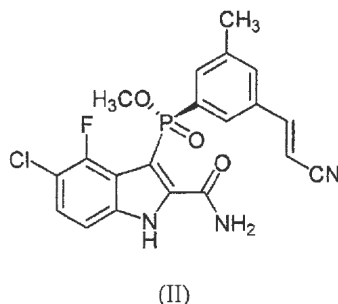
R^1 es hidrógeno;

Y es O-R;

Z es amido, carboxilo o carbonilo; y

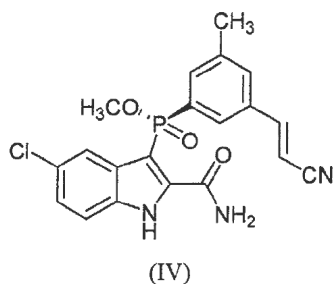
cada R es independientemente hidrógeno o alquilo.

5 Se describe un compuesto puro o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



en donde la configuración absoluta en el átomo de fósforo es S.

Se describe un compuesto puro o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos:



10

en donde la configuración absoluta en el átomo de fósforo es S.

Se describe un compuesto puro seleccionado del grupo que consiste en:

éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(S)-fosfínico; y

éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-4-fluoro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(S)-fosfínico,

15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, ésteres o profármacos.

En ciertas realizaciones, el compuesto de la presente invención es el compuesto enantiómeramente puro o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, el compuesto enantiómeramente puro comprende al menos aproximadamente 80% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 20% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 90% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 10% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 95% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 5% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 96,6% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 3,4% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 97% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 3% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 99% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 1% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros o al menos aproximadamente 99,9% en peso del enantiómero indicado y como mucho aproximadamente 0,1% en peso del otro enantiómero o el otro o los otros estereoisómeros. En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total del compuesto.

30 También se describen compuestos que se pueden aportar como un éster o profármaco que, al administrarlo al receptor, proporciona directamente o indirectamente un compuesto proporcionado en la presente memoria o que exhibe por sí mismo la actividad deseada.

Salas farmacéuticamente aceptables, profármacos, estereoisómeros y tautómeros

El compuesto de la presente invención se puede administrar como cualquier sal que al administrarla al receptor sea capaz de proporcionar directamente o indirectamente el compuesto original o que exhiba actividad por sí mismo. Ejemplos no limitativos son sales farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Modificaciones como estas pueden afectar a la actividad biológica del compuesto, en algunos casos incrementando la actividad por encima del compuesto original.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere al estado de un compuesto en el que el compuesto porta un ion conjugado que es farmacéuticamente aceptable, y en donde la sal retiene la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en la presente memoria mientras que exhibe efectos toxicológicos no deseados mínimos. Tales sales son formas atóxicas terapéuticamente útiles de los compuestos de la presente invención. Cualquier sal que retenga la actividad biológica deseada de los compuestos contenidos en la presente memoria y que exhiba efectos toxicológicos mínimos o no indeseados está destinada a la inclusión en la presente. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos y bases orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. También encuentran uso en la presente memoria ácidos y bases no farmacéuticamente aceptables, como, por ejemplo, en la síntesis y/o la purificación de los compuestos de interés.

Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, e incluyen tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato, salicilato, sulfato, sulfonato, nitrato, bicarbonato, hidrobromato, hidrobromuro, hidroyoduro, carbonato y sales de ácido fosfórico. Una realización particular es la sal de mono- o dihidrocloruro. Sales adecuadas incluyen las derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros muchos ácidos muy conocidos en la especialidad farmacéutica. Profármacos farmacéuticamente aceptables se refiere a un compuesto que es metabolizado, por ejemplo hidrolizado u oxidado, en el huésped para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en un resto funcional del compuesto activo, incluyendo pero no limitados a un resto éster o acilo. Los profármacos incluyen compuestos que se pueden oxidar, reducir, aminor, desaminar, hidroxilar, deshdroxilar, hidrolizar, deshdrolizar, alquilar, desalquilar, acilar, desacilar, fosforilar, desfosforilar para producir el compuesto activo.

Se pueden obtener sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos estándar muy conocidos en la especialidad, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado proporcionando un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de metales alcalinos (tales como potasio, sodio o litio) o metales alcalinotérreos (tales como calcio).

Ejemplos no limitativos de sales adecuadas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido bicarbónico, ácido carbónico; y sales formadas con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido malónico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pámico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido tósico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido α -cetoglútamico, ácido α -glicerofosfórico y ácido poligalacturónico. Sales adecuadas incluyen las derivadas de metales alcalinos tales como litio, potasio y sodio, de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, así como de otras bases muy conocidas por los expertos en la especialidad farmacéutica. Otras sales adecuadas incluyen las derivadas de cationes metálicos tales como cinc, bismuto, bario o aluminio o con un catión formado a partir de una amina, tal como amoníaco, *N,N*-dibenciletilendiamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina. Por otra parte, sales adecuadas incluyen las derivadas de una combinación de ácidos y bases, tales como, por ejemplo, una sal de tanato de cinc.

Un profármaco farmacéuticamente aceptable se refiere a un compuesto que se metaboliza (es decir, se hidroliza u oxida, por ejemplo) en el huésped para formar un compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en un resto funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que se pueden oxidar, reducir, aminor, desaminar, hidroxilar, deshdroxilar, hidrolizar, deshdrolizar, alquilar, desalquilar, acilar, desacilar, fosforilar y/o desfosforilar para producir el compuesto activo.

Se describen en la presente memoria compuestos que se metabolizan en un compuesto que exhibe actividad antiviral contra HIV.

Compuestos para el uso en métodos de tratamiento

En una realización, se proporciona un compuesto de Fórmula III o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para el uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de una infección por HIV en un huésped. El compuesto se puede combinar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, el 3-fosfoindol puede ser de Fórmula III, con estereoquímica absoluta R.

En otras realizaciones el huésped se puede diagnosticar mediante la medida de una concentración de anticuerpo anti-HIV en sangre. En otra realización, el compuesto se administra para reducir o prevenir síntomas del sida

(síndrome de inmunodeficiencia adquirida) en un huésped. En otra realización más, el compuesto se administra a un huésped con riesgo de infección con HIV.

En otra realización, el compuesto activo exhibe actividad contra formas de HIV resistentes a fármacos, y así exhibe resistencia cruzada disminuida contra terapias antivirales actualmente aprobadas. La expresión "actividad contra una forma de HIV resistente a fármacos" significa que un compuesto (o su profármaco o sal farmacéuticamente aceptable) es activo contra la cepa mutante con una EC_{50} , p. ej., de menos de aproximadamente 50, 25, 10 o 1 de concentración micromolar. En una realización, el inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico (NNRTI) presenta una EC_{50} (en concentración molar) contra una cepa de HIV mutante de menos de aproximadamente 5, 2,5, 1 o 0,1 micromolar. En una realización no limitativa, la cepa mutante de HIV tiene una mutación de transcriptasa inversa en lisina 103 → asparagina y/o tirosina 181 → cisteína.

Se puede determinar la capacidad de los compuestos proporcionados en la presente memoria para inhibir la actividad de transcriptasa inversa in vitro según métodos de identificación sistemática estándar. El espectro de actividad exhibido por cualquier compuesto particular se determina evaluando el compuesto en ensayos descritos en esta memoria descriptiva o con otros ensayos confirmadores conocidos por los expertos en la especialidad de los compuestos anti-HIV. Los compuestos pueden exhibir una EC_{50} de menos de 10-15 μ M.

La eficacia de los 3-fosfoindoles se puede medir mediante el inmunoensayo de adsorción ELISA (por sus siglas en inglés) específico para HIV, p24. La eficacia del fármaco se expresa como porcentaje de inhibición del antígeno p24 de HIV en este ensayo rápido y sensible. La eficacia del compuesto anti-HIV se puede determinar mediante un "ensayo de reducción de calvas" que mide la concentración de compuesto necesaria para reducir el número de calvas del virus in vitro, según los métodos indicados más particularmente en la presente memoria, en 50% (es decir, la EC_{50} del compuesto). El compuesto puede exhibir una EC_{50} de menos de 15 o menos de 10 micromolar hasta cantidades nanomolares in vitro.

Terapia de combinación o alternancia

En ciertas realizaciones, el compuesto indólico se administra en combinación y/o alternancia con uno o más agentes anti-HIV. En otra realización, la administración de dos o más agentes anti-HIV da como resultado un efecto sinérgico en la inhibición de HIV. En otra realización, el efecto de administrar dos o más de tales agentes en combinación y/o alternancia produce un efecto aditivo en la inhibición de la replicación de HIV.

En ciertas realizaciones, el compuesto indólico se administra en combinación y/o alternancia con uno o más agentes anti-HBV o uno o más anti-HCV. Por poner un ejemplo, en ciertas realizaciones, el compuesto indólico se puede administrar a un huésped coinfectado con HIV y HBV en combinación con un agente eficaz para el tratamiento de HBV. El agente eficaz para el tratamiento de HBV puede ser cualquiera de tales agentes conocido por los expertos en la especialidad. Agentes ejemplares se describen en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el compuesto indólico se puede administrar a un huésped coinfectado con HIV y HCV en combinación con un agente eficaz para el tratamiento de HCV. El agente eficaz para el tratamiento de HCV puede ser cualquiera de tales agentes conocido por los expertos en la especialidad.

En ciertas realizaciones, el compuesto indólico se administra en combinación y/o alternancia con uno o más agentes que son metabolizados por citocromo P450 monooxigenasa. El agente puede ser cualquier agente conocidos por los expertos en la especialidad por ser metabolizado por una citocromo P450 monooxigenasa. Agentes ejemplares se describen en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el citocromo P450 es citocromo P450 3A4, citocromo P450 2C8 o citocromo P450 2C9.

En una terapia de combinación, dosificaciones eficaces de uno o más agentes se administran conjuntamente, mientras que durante la terapia de alternancia se administra en serie una dosificación eficaz de cada agente. Las dosificaciones dependerán de las velocidades de absorción, desactivación y excreción de los fármacos así como otros factores conocidos por los expertos en la especialidad. Los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Para cualquier individuo particular, los regímenes y los esquemas de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo para cumplir las necesidades del individuo y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones.

La resistencia a fármacos se produce lo más típicamente por la mutación de un gen que codifica una enzima usada en el ciclo de replicación viral. Se ha demostrado que la eficacia de un fármaco anti-HIV se puede prolongar, aumentar o restaurar administrando el compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y quizás tercer, compuesto antiviral que induce una mutación o mutaciones diferentes de la seleccionada por el fármaco principal. Tales combinaciones reducen simultáneamente la posibilidad de resistencia a cualquier fármaco individual y cualesquiera efectos tóxicos asociados. Alternativamente, la farmacocinética, la biodistribución u otros parámetros del fármaco pueden ser alterados por tal terapia de combinación o alternancia. Por ejemplo, el uso de una combinación de fármacos puede permitir que un fármaco individual dentro de esa combinación se aporte en una dosificación inferior a la que se requeriría cuando el fármaco se administra como una monoterapia. Asimismo, cuando se combinan fármacos que tienen como diana diferentes estadios del ciclo vital viral, existe la posibilidad de potenciar sus efectos. Por otra parte, el uso de combinaciones de fármacos podría disminuir o eliminar efectos

secundarios no deseables de un único fármaco mientras que produciría todavía actividad antiviral. En general, la terapia de combinación se prefiere típicamente sobre la terapia de alternancia debido a que plantea múltiples presiones simultáneas sobre el virus.

Agentes para HCV

5 Los interferones (IFN) para el tratamiento de la hepatitis crónica han estado disponibles comercialmente desde hace casi una década, y forman la base de las terapias aprobadas actualmente disponibles para HCV. Los IFN son glicoproteínas producidas por células inmunitarias en respuesta a infecciones virales. Inhiben la replicación de un número de virus, incluyendo HCV, y cuando se usan como el único tratamiento para la infección con hepatitis C, los IFN a veces pueden suprimir el RNA de HCV sérico hasta niveles indetectables. Además, los IFN pueden normalizar los niveles séricos de aminotransferasa. Desgraciadamente, el efecto de los IFN es temporal, y se produce una respuesta sostenida solo en 8-9% de los pacientes infectados crónicamente con HCV (Gary L. Davis, *Gastroenterology*, **2000**, 118:S104-S114). Sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen dificultad para tolerar el tratamiento con interferones, que provoca síntomas gripales graves, pérdida de peso y falta de energía y resistencia.

15 Muchas patentes divulgan tratamientos contra *Flaviviridae*, incluyendo HCV, que usan terapias basadas en interferones. Por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.980.884 de Blatt et al. divulga métodos para el retratamiento de pacientes afectados por HCV usando interferón de consenso. La Patente de EE. UU. N° 5.942.223 de Bazer et al. divulga una terapia anti-HCV que usa interferón τ ovino o bovino. La Patente de EE. UU. N° 5.928.636 de Alber et al. divulga la terapia de combinación de interleuquina 12 e interferón α para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyendo HCV. La Patente de EE. UU. N° 5.849.696 de Chretien et al. divulga el uso de timosinas, solas o en combinación con interferón, para tratar HCV. La Patente de EE. UU. N° 5.830.455 de Valtuena et al. enseña una terapia de combinación para HCV que emplea interferón y un eliminador de radicales libres. La Patente de EE. UU. N° 5.738.845 de Imakawa enseña el uso de proteína de interferón τ humano para tratar HCV. Otros tratamientos basados en interferones para HCV se dan en la Patente de EE. UU. N° 5.676.942 de Testa et al. y la Patente de EE. UU. N° 5.372.808 de Blatt et al. Un número de patentes también divulga formas pegiladas de interferones y su uso, tales como, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 5.747.646, 5.792.834 y 5.834.594, todas de Hoffmann-LaRoche, Inc.; los documentos PCT WO 99/32139 y WO 99/32140 de Enzon; el documento WO 95/13090 y las Patentes de EE. UU. N° 5.738.846 y 5.711.944 de Schering Corporation; y la Patente de EE. UU. N° 5.908.621 de Glue et al.

30 El interferón α -2a y el interferón α -2b están aprobados actualmente como monoterapia para el tratamiento de HCV. ROFERON®-A de Roche es la forma recombinante del interferón α -2a. PEGASYS® de Roche es la forma pegilada o modificada con polietilenglicol del interferón α -2a. INTRON® A de Schering Corporation es la forma recombinante del interferón α -2b y PEG-INTRON® de Schering Corporation es la forma pegilada del interferón α -2b.

35 Actualmente están desarrollándose otras formas de interferón α así como interferón β , γ , τ y ω para el tratamiento de HCV. Ejemplos incluidos en la presente son INFERGEN, interferón α de consenso 1, de InterMune; OMNIFERON, un interferón natural, de Viragen; ALBUFERON de Human Genome Sciences; REBIF, interferón β -1a, de Ares-Serono; Omega Interferon de BioMedicine; Oral Interferon Alpha de Amarillo Biosciences; e interferones γ , τ y ω 1-b de InterMune.

40 La ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1-1,2,4-triazolil-3-carboxamida) es un análogo nucleosídico de amplio espectro, no inductor de interferones, sintético, vendido bajo el nombre comercial Virazole (The Merck Index, 11ª Ed., **1989**, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ; p. 1304). Véase la Pat. EE. UU. N° 3,798,209 y el documento RE29.835. Estructuralmente, la ribavirina es similar a la guanosina y tiene actividad in vitro contra varios virus de DNA y RNA incluyendo *Flaviviridae* (Gary L. Davis, **2000**, *Gastroenterology*, 118:S104-S114).

45 La ribavirina reduce los niveles séricos de aminotransferasa hasta los normales en 40% de los pacientes, pero no disminuye los niveles de RNA de HCV (Gary L. Davis, **2000**, *Gastroenterology*, 118:S104-S114). Así, la ribavirina sola no es eficaz para reducir niveles de RNA viral. Además, la ribavirina tiene una toxicidad significativa y se sabe que induce anemia. No está aprobada para la monoterapia contra HCV, pero ha sido aprobada en combinación con interferón α -2a o interferón α -2b para el tratamiento de HCV.

50 El patrón actual de cuidado para la hepatitis C crónica es una terapia de combinación con un interferón α y ribavirina. Los estudios han mostrado que responden más pacientes con HCV a la combinación de interferón α pegilado/ribavirina que a la terapia de combinación con interferón α no pegilado. Sin embargo, como con la monoterapia, se desarrollan efectos secundarios significativos durante la terapia de combinación, incluyendo hemólisis, síntomas gripales, anemia y fatiga (Gary L. Davis, **2000**, *Gastroenterology*, 118:S104-S114).

55 Una terapia de combinación con cápsulas de PEG-INTRON® (peg-interferón α -2b) y REBETOL® (Ribivarin, USP) está disponible de Schering Corporation. REBETOL® de Schering Corporation también se ha aprobado en combinación con INTRON® A (interferón α -2b recombinante de Schering Corporation). PEGASYS® (interferón α -2a pegilado) y COPEGUS® (ribavirina) de Roche también se han aprobado para el tratamiento de una infección por HCV.

Los documentos PCT WO 99/59621, WO 00/37110, WO 01/181359, WO 02/32414 y WO 03/024461, todos de

Schering Corporation, divulgan el uso de una terapia de combinación de interferón α pegilado y ribavirina para el tratamiento de la infección por HCV. Los documentos PCT WO 99/15194, WO 99/64016 y WO 00/24355, todos de Hoffmann-LaRoche, Inc., también divulgan el uso combinado de interferón α pegilado y ribavirina para el tratamiento de la infección por HCV.

- 5 Se están desarrollando nuevos agentes antivirales para tratar infecciones por *Flaviviridae*, especialmente para infecciones por el hepacivirus HCV. Se están estudiando inhibidores específicos de enzimas derivadas de HCV como proteasa, helicasa y polimerasa. También se están investigando fármacos que inhiben etapas en la replicación de HCV e incluyen fármacos que bloquean la producción de antígenos de HCV a partir de RNA (inhibición de IRES), fármacos que impiden el procesamiento normal de proteínas de HCV (inhibidores de la glicosilación), fármacos que
10 bloquean la entrada de HCV en las células tal como bloqueando sus receptores, y agentes citoprotectores no específicos que bloquean el daño a las células provocado por la infección viral. Por otra parte, se están investigando enfoques moleculares para tratar la infección por virus de la hepatitis C. Por ejemplo, se están realizando estudios de ribozimas, enzimas que descomponen moléculas de RNA viral específicas y oligonucleótidos antisentido, que son pequeños segmentos complementarios de DNA que se ligan a e inhiben RNA viral. Una revisión de los tratamientos de HCV se puede encontrar en Bymock et al., *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **2000**, 11:2 y De Francesco et al., *Antiviral Res.*, **2003**, 58:1-16.

Otras clases de fármacos que se están desarrollando para tratar infecciones por *Flaviviridae* e infecciones por hepatitis C incluyen en particular:

1) Inhibidores de proteasas:

- 20 a. Inhibidores de NS3 proteasa basados en sustrato son divulgados por Attwood et al. en los documentos WO 98/22496 y DE 19914474; por Attwood et al. en *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **1999**, 10:259-273; y por Tung et al. en el documento WO 98117679, que incluye alfacetoamidas e hidracinouras;
- b. Inhibidores del sustrato que terminan en un electrófilo como ácido borónico o fosfonato son mostrados por Llinas-Brunet et al. en el documento WO 99/07734;
- 25 c. Inhibidores de NS3 proteasa no basados en sustrato tales como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitrobenzamida, RD3-4082 y RD3-4078 (el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos y teniendo el último un grupo para-fenoxifenilo), mostrados por Sudo et al. en *Biochemical and Biophysical Res. Comm.*, **1997**, 238:643-7, y en *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **1998**, 9:186;
- 30 d. Sch 68631, una fenantrenoquinona, divulgada por Chu et al. en *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37:7229-32, y Sch 351633, aislada del hongo *Penicillium griseofulvum*, divulgada por Chu et al. en *Bioorganic and Medicinal Chem. Lett.*, 9: 1949-52;
- e. Eglina c, una macromolécula aislada de sanguijuela, que exhibe inhibición de potencia nanomolar contra varias serina proteasas como proteasas de *S. griseus* A y B, α -quimotripsina, quimasa y subtilisina, según se divulga por Qasim et al., *Biochemistry*, **1997**, 36:1598-1607;
- 35 f. Inhibidores de cisteína proteasa para inhibir endopeptidasa 2 de HCV, como los divulgados en la Pat. EE. UU. N° 6.004.933 de Spruce et al.;
- g. Inhibidores sintéticos de NS3 proteasa o cofactor NS4A del virus de la hepatitis C que son subsecuencias de sustratos utilizados por la proteasa y/o el cofactor, como los mostrados en Pat. EE. UU. N° 5.990.276 de Zhang et al.;
- 40 h. Enzimas de restricción para tratar HCV como las divulgadas en Pat. EE. UU. N° 5.538.865 de Reyes et al.;
- i. Péptidos tales como inhibidores de NS3 serina proteasa de HCV como los mostrados en el documento WO 02/008251 de Corvas International, Inc., y en los documentos WO 02/08187 y WO 02/008256 de Schering Corporation;
- 45 j. Inhibidores de tripéptidos de HCV, como los divulgados en Pat. EE. UU. N° 6.534.523, 6.410.531 y 6.420.380 de Boehringer Ingelheim y el documento WO 02/060926 de Bristol Myers Squibb;
- k. Péptidos diarílicos como inhibidores de serina proteasa de HCV como los enseñados por Schering Corporation en WO 02/48172;
- 50 l. Imidazolidinonas como inhibidores de NS3 serina proteasa de HCV como los divulgados en el documento WO 02/08198 de Schering Corporation y el documento WO 02/48157 de Bristol Myers Squibb; y
- m. Inhibidores de proteasa de HCV como los enseñados por Vertex Pharmaceuticals en el documento WO 98/17679 y por Bristol Myers Squibb en el documento WO 02/48116.

- 2) Derivados de tiazolidina que muestran una inhibición apropiada en un ensayo de HPLC en fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y un sustrato de NS5A/5B, como los presentados por Sudo et al., *Antiviral Res.*, **1996**, 32:9-18, especialmente los compuestos RD4 6205, RD4 6193 y RD-1-6250 que tienen un resto cinamoilo condensado sustituido con una cadena alquílica larga;
- 5 3) Tiazolidinas y benzanilidas como las divulgadas por Kakiuchi et al., *J. EBS Letters*, 421:217-220 y Takeshita et al., *Analytical Biochemistry*, **1997**, 247:242-46;
- 4) Inhibidores de helicasa como los divulgados por Diana et al. en Pat. EE. UU. N° 5.633.358 y el documento WO 97/36554;
- 10 5) Inhibidores de nucleótido polimerasa y una gliotoxina como los mostrados por R. Ferrari et al., *J. Virology*, **1999**, 73:1649-54;
- 6) Cerulenina, un producto natural mostrado por V. Lohmann et al., *Virology*, **1998**, 249:108-118;
- 7) Oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN) complementarios a tramos de secuencia en la región no codificante (NCR) 5' del virus *Flaviviridae* son presentados por M. Alt et al., *Hepatology*, **1995**, 22:707-717;
- 15 8) Nucleótidos 326-348 que comprenden el extremo 3' de la NCR y nucleótidos 371-388 situados en la región codificante central del RNA de HCV, como los mostrados por M. Alt et al., *Archives of Virology*, **1997**, 142:589-599; Galderisi et al., *J. of Cellular Physiology*, **1999**, 181:251-257;
- 9) Inhibidores de la traducción dependiente de IRES como los divulgados por Ikeda et al., documento JP-08268890, y Y. Kai et al., documento JP-10101591;
- 20 10) Ribozimas, tales como ribozimas resistentes a nucleasas como las mostradas por D.D. Maccjak et al., *Hepatology*, **1999**, 30: compendio n° 995; Barber et al. en Pat. EE. UU. N° 6.043.077 y Draper et al. en los documentos U.S. 5.869.253 y 5.610.054;
- 25 11) Análogos nucleosídicos que incluyen el uso de nucleósidos ramificados en el tratamiento de flavivirus, pestivirus y hepacivirus, como los mostrados por Idenix Pharmaceuticals en los documentos WO 01/92282, WO 01/90121, U.S. 6.812.219 y U.S. 6.914.054, en los que se divulga un método para el tratamiento de la infección por hepatitis C, pestivirus y/o flavivirus en seres humanos y otros animales huésped que incluye administrar una cantidad eficaz de nucleósidos β -D o β -L ramificados en 1', 2', 3' o 4' biológicamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o derivados, administrados bien solos o bien en combinación con otro agente antiviral, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Análogos nucleosídicos también se encuentran en los documentos WO 01/32153 y WO 01/60315 de Biochem Pharma, Inc. (ahora Shire Biochem, Inc.); los documentos WO 02/057425 y WO 02/057287 presentados por Merck & Co., Inc.; el documento WO 02/18404 de Roche; los documentos WO 01/79246, WO 02/32920 y WO 02/48165 de Pharmasset, Ltd. y el documento WO 99/43691 de Emory University. En la Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae, 16th International Conference on Antiviral Research, 27 de abril de 2003, Savannah, GA, nucleósidos modificados en 2' para la inhibición de HCV fueron descritos por Eldrup et al.; análogos nucleosídicos como posibles inhibidores de la replicación de RNA de HCV fueron enseñados por Bhar et al. (p. A 75), en donde el autor presentaba que los nucleósidos modificados en 2' demuestran una potente actividad inhibidora en ensayos de replicones basados en células; el efecto de nucleósidos modificados en 2' sobre la replicación de RNA de HCV fue presentado por Olsen et al. (p. A76).
- 30 12) Compuestos variados que se desarrollan para tratar infecciones por *Flaviviridae* e infecciones por hepatitis C incluyen en particular: 1-amino-alquilciclohexanos como los descritos en la Pat. EE. UU. N° 6.034.134 de Gold et al.; lípidos alquilados, vitamina E y otros antioxidantes en la Pat. EE. UU. N° 5.922.757 de Chojkier et al.; escualeno, amantadina y ácidos biliares como los mostrados en la Pat. EE. UU. N° 5.846.964 de Ozeki et al.; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico y piperidinas como los encontrados en la Pat. EE. UU. N° 5.830.905 Diana et al.; bencenodicarboxamidas como las divulgadas en la Pat. EE. UU. N° 5.633.388 de Diana et al.; derivados de ácido poliadenílico como los descritos en la Pat. EE. UU. N° 5.496.546 de Wang et al.; 2',3'-didesoxiinosina como la encontrada en la Pat. EE. UU. N° 5.026.687 de Yarchaon et al.; bencimidazoles como los presentados en la Pat. EE. UU. N° 5.891.874 de Colacino et al.; y extractos vegetales como los mostrados en la Pat. EE. UU. N° 5.837.257 de Tsai et al. y la Pat. EE. UU. N° 5.725.859 de Omer et al.
- 45 13) Compuestos actualmente en desarrollo clínico o preclínico para el tratamiento del virus de la hepatitis C, incluyendo: Interleuquina 10 de Schering Plough; IP-501 de Interneuron; Merimebodib (VX-497) de Vertex; AMANTADINE® (Symmetrel) de Endo Labs Solvay; HEPTAZYME® de RPI; IDN-6556 de Idun Pharmaceuticals; XTL-002 de XTL; HCV/MF59 de Chiron; CIVACIR® (inmunoglobulina de hepatitis C) de NABI; LEVOVIRIN® de ICN/Ribapharm; VIRAMIDINE® de ICN/Ribapharm (Valeant); ZADAXIN® (timosina α -1) de Sci Clone; timosina más interferón pegilado de Sci Clone; CEPLINE® (dihidrocloruro de histamina) de Maxim; VX 950/LY 570310 de Vertex/Eli Lilly; ISIS 14803 de Isis Pharmaceutical/Elan; JTK 003 de AKROS Pharma; BILN-2061 de Boehringer Ingelheim; CellCept (micofenolato de mofetilo) de Roche; T67 (inhibidor de tubulina β) de Tularik; una vacuna terapéutica dirigida a E2 de Innogenetics; FK788 de Fujisawa Healthcare, Inc.; IdB 1016 (Siliphos, fitosoma de silibina-fosfatidilcolina); un inhibidor de la replicación de RNA VP50406 de ViroPharma/Wyeth; vacunas terapéuticas
- 50
- 55

de Intercell y Epimmune/Genencor; un inhibidor de IRES de Anadys; ANA 245 y ANA 246 de Anadys; inmunoterapia "Therapore" de Avant; inhibidores de proteasas de Bristol Myers Squibb/Axys y Corvas/Schering; un inhibidor de helicasa de Vertex; un inhibidor de la fusión de Trimeris; terapia con células T de CellExSys; un inhibidor de polimerasa de Biocryst; química de RNA elegido como diana de PTC Therapeutics; Dication de Immtech, International; inhibidores de proteasa de Agouron y Chiron/Medivir; terapias antisentido de AVI BioPharma e Hybridon; un hemopurificador de Aethlon Medical; una vacuna terapéutica de Merix; "Chron-VacC", una vacuna terapéutica, de Tripep; UT 231 B de United Therapeutics; inhibidores de proteasas, helicasas y polimerasas de Genelabs Technologies; inhibidores de IRES de Immusol; R803 de Rigel Pharmaceuticals; INFERGEN® (interferón α de consenso 1) de InterMune; OMNIFERON® (interferón natural) de Viragen; ALBUFERON® de Human Genome Sciences; REBIF® (interferón β -1a) de Ares-Serono; Omega Interferon de BioMedicine; Oral Interferon Alpha de Amarillo Biosciences; interferones γ , τ y ω 1-b de InterMune; interferón de consenso de Valeant; Nexavar de Onyx Pharmaceuticals; PI-88 de Progen Industries; doxorubicina Transdrug de BioAlliance Pharma; JBK-122 de Jenken Biosciences; Valopicitabine de Idenix; VOX-410C de VGX Pharmaceuticals; Celgosivir de Migenix; Suvus de Bioenvision; Multiferon de Viragen; interferón ω de Intarcia; INNO0101 (E1) de Innogenetics; PF-03491390 de Pfizer; interferón Medusa de Flamel Technologies; IC41 de Intercell; SCH 503034 de Schering; G126270 de GlaxoSmithKline; GV1001 de Pharmexa; R1626 de Roche; Maxygen/Roche; R7128 de Pharmasset/Roche; Belerofon de Nautilus Biotech; Alinia de Romark; Bavituximab de Peregrine; Oral Interferon Alpha de Amarillo Biosciences; NOV-205 de Novelos; CGI 5005 de Globelimmune; HCV-796 de ViroPharma/Wyeth; HCV/MF59 de Chiron/Norvartis; EMZ702 de Transition Therapeutics; AVI-4065 de Biopharma; ANA975 de ANADYS; MitoQ de Antipodean Pharmaceuticals, Inc; ACH-0137171 de Achillion Pharmaceuticals; R1626 de Roche; XTL-2125 de XTL; XTL-6865 de XTL; BLX-883 de Biolex Therapeutics/OctoPlus; DEBIO-025 de DEBIO; y UT-231B de United Therapeutics; y

14) Profármacos nucleosídicos como los descritos previamente para el tratamiento de otras formas de hepatitis, incluyendo 2'-desoxi- β -L-nucleósidos y sus profármacos 3' para el tratamiento de HBV como los divulgados en los documentos WO 00/09531 y WO 01196353 de Idenix Pharmaceuticals; y ésteres terapéuticos de aciclovir como los mostrados en la Pat. EE. UU. N° 4.957.924 de Beauchamp.

Otros ejemplos de agentes antivirales que se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, agentes tales como VX-950 e interferón. Interferones que se pueden usar incluyen productos de interferón α -2b, Intron® A y PEG-Intron™ de Schering-Plough; y Co-Pegasus y PEGASYS (interferón α -2a pegilado) de Hoffman LaRoche.

Agentes para la hepatitis B

El agente para la hepatitis B puede ser cualquier agente conocido por los expertos en la especialidad por ser eficaz para el tratamiento de la infección por hepatitis B en un huésped que lo necesite. En ciertas realizaciones, el agente para la hepatitis B es interferón α (Intron A, Schering-Plough), interferón pegilado (Pegasys, Roche), lamivudina (Epivir-HBV, Zeffix o Heptodin, Glaxo-SmithKline), adefovir dipivoxil (Hepsera, Gilead), entecavir (Baraclude, Bristol-Myers-Squibb), telbivudina (Tyzeka o Sebivo, Idenix) o inmunoglobulina de HBV (HyperHEP S/D, Talecris; Nabi-HBV, Nabi; Hepa Gam B, Cangene).

En ciertas realizaciones, el agente para la hepatitis B es FTC (Emtricitabine, Gilead), L-FMAU (Clevudine, Pharmasset; Levovir, Bukwang), tenofovir (Viread, Gilead), monoval LdC (Valtorcitabine, Idenix), DAPD (Amdoxovir, RFS Pharm LLC), Ana 380 (LB80380, Anadys), remofovir (Pradefovir, Schering-Plough), racivir (RCV, Pharmasset), BAM-205 (NOV-205, Novelos), XTL-001 (HepeX-B, XTL Biopharm, Cubist), nitoxanida (Alinia, Romark Labs), UT 231-B (United Therapeutics), Bay 41-4109 (Bayer), EHT899 (Enzo Biochem), timosina α -1 (Zadaxin, SciClone), Hi-8 HBV (Oxxon), ciRNA (HepX, Nucleonics), HepaVaxx B (Virexx), HBV Core Antigen Vaccine (Emergent Europe) o SpecitEx-HepB (Chromos).

Otros agentes antivirales

Cualquiera de los tratamientos virales descrito en cualquier parte de los Antecedentes de la invención en la presente memoria se puede usar en combinación o alternancia con los compuestos descritos en esta memoria descriptiva. Ejemplos no limitativos incluyen a) inhibidores de proteasa; b) derivados de tiazolidina; c) inhibidores de helicasa; d) benzanilidas; e) fenantrenoquinonas; f) inhibidores de polimerasa, y gliotoxina; g) oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN); h) inhibidores de la traducción dependiente de IRES; i) ribozimas; j) análogos nucleosídicos; k) análogos nucleosídicos disustituídos como los divulgados por Idenix Pharmaceuticals en los documentos WO 01/90121, WO 01/92282, WO 04/00300, WO 04/002999 y WO 04/002422; l) análogos 2'-fluoronucleosídicos; m) 1-NH₂-alquilciclohexanos; n) lípidos alquilados; o) vitamina E y otros antioxidantes; p) escualeno, amantadina y ácidos biliares; q) ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico; r) bencenodocarboxamidas; s) derivados de ácido poliadenílico; t) bencimidazoles; u) 2',3'-didesoxiinosina; v) extractos vegetales; w) piperidinas; y x) otros compuestos actualmente en desarrollo preclínico o clínico para el tratamiento de pestivirus, flavivirus y/o hepacivirus, incluyendo ribavirina y las familias de interferones.

El segundo agente antiviral para el tratamiento de HIV puede ser, por ejemplo, un inhibidor de proteasa, un inhibidor de integrasa de HIV-1, un inhibidor de quimocina o un inhibidor de transcriptasa inversa ("RTI", por sus siglas en

inglés), el último de los cuales puede ser bien un inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídico ("NRTI", por sus siglas en inglés) sintético o bien un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico ("NNRTI"). En otras realizaciones, un segundo o tercer compuesto puede ser un análogo de pirofosfato o un inhibidor de la fusión-unión. Una lista que compila datos de resistencia recogidos in vitro e in vivo para ciertos compuestos antivirales se encuentra en Schinazi et al., Mutations in retroviral genes associated with drug resistance, *International Antiviral News*, 1997, 5(8).

En ciertas realizaciones, el compuesto indólico se administra en combinación y/o alternancia con FTC (2',3'-didesoxi-3'-tia-5-fluorocitidina); 141W94 (amprenavir, Glaxo Wellcome, Inc.); Viramune (nevirapina); Rescriptor (delavirdina); DMP-266 (efavirenz); DDI (2',3'-didesoxiinosina); 3TC (3'-tia-2',3'-didesoxicitidina); DDC (2',3'-didesoxicitidina), abacavir (1592U89), que es succinato de (1S,4R)-4-[(2-amino-6-ciclopropil-amino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol, Tenofovir DF (Viread), D4T o AZT.

Otros ejemplos de agentes antivirales que se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, foscarnet; carbovir; aciclovir; interferón; inhibidores de la fusión tales como enfuvirtida; y nucleósidos de β -D-dioxolano tales como β -D-dioxolanilguanina (DXG), β -D-dioxolanil-2,6-diaminopurina (DAPD) y β -D-dioxolanil-6-cloropurina (ACP). Interferones que se pueden usar incluyen productos de interferón α -2b de Schering-Plough, Intron® A y PEG-Intron™; y Co-Pegasus y PEGASYS (interferón α -2a pegilado) de Hoffman La Roche. Combinaciones con las que se pueden administrar los 3-fosfoindoles incluyen Epzicom (ABC+ 3TC), Trizivir (ABC + 3TC + AZT), Truvada (FTC + Viread) y Combivir (AZT+3TC).

Ejemplos de inhibidores de proteasa que se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, indinavir (sulfato de {1-(1S,2R),5(S)}-2,3,5-tridesoxi-N-(2,3-dihidro-2-hidroxi-1H-inden-1-il)-5-[2-[(1,1-dimetiletil)amino]carbonil]-4-(3-piridinilmetil)-1-piperacini]-2-(fenilmetil)-D-eritro-pentoamida; Merck & Co., Inc.); nelfinavir (Agouron); ritonavir (Abbott Labs), saquinavir (Roche); Amprenavir; Atazanavir; Fosamprenavir; Kaletra; y DMP-450 bismesilato de {[4R-4-(r-a,5-a,6-b,7-6)-hexahidro-5,6-bis(hidroxi)-1,3-bis(3-amino)-fenil]metil-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona} (Triangle Pharmaceuticals, Inc.).

Otros compuestos que se pueden administrar en combinación o alternancia con el fosfoindol para aumentar sus propiedades antivirales incluyen succinato de (1S,4R)-4-[2-amino-6-ciclopropil-amino-9H-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol (1592U89, un análogo de carbovir, de GlaxoSmithKline); BILA 1906 (N-{1S-[(3-[2S-{(1,1-dimetiletil)amino]carbonil}-4R)-3-piridinilmetil]tio}-1-piperidinil]-2R-hidroxi-1S-fenilmetil]propil]-amino]carbonil]-2-metilpropil]-2-quinolinocarboxamida) (Bio Mega/Boehringer Ingelheim); BILA 2185 (N-(1,1-dimetiletil)-1-[2S-[[2,6-dimetil-fenoxil]-1-oxoetil]amino]-2R-hidroxi-4-fenilbutil]-4R-piridinil-2-piperidincarboxamida) (Bio Mega/Boehringer Ingelheim); BM+51.0836 (derivado de triazoloisindolinona) y BMS 186,318 (inhibidor de HIV-1 proteasa derivado de aminodiol) (Bristol-Myers Squibb); d4API (9-[2,5-dihidro-5-(fosfonometoxi)-2-furanil]-adenina) (Gilead); HBY097 (S-4-isopropoxycarbonil-6-metoxi-3-[metiltio-metil]-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-tione); HEPT (1-[(2-hidroxi-etoxi)metil]6-[feniltio]-timina); KNI-272 (tripéptido que contiene ácido (2S,3S)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutírico); L-697,593 (5-etil-6-metil-3-(2-ftalimido-etil)piridin-2(1H)-ona); L-732,524 (inhibidor de HIV-1 proteasa de hidroxiaminopentano) (Merck & Co.); L-697,661 (3-[[(-4,7-dicloro-1,3-benzoxazol-2-il)metil]amino]-5-etil-6-metil-piridin-2(1H)-ona); L-FDDC ((-)- β -L-5-fluoro-2',3'-didesoxicitidina); L-FDOC ((-)- β -L-5-fluorodioxolanocitosina); PFA (fosfonoformiato; "foscarnet"; Astra); PMEa (9-(2-fosfonilmetoxietil)adenina) (Gilead); PMPA ((R)-9-(2-fosfonilmetoxi-propil)-adenina) (Gilead); Ro 31-8959 (inhibidor de proteasa de HIV-1 derivado de hidroxietilamina) (Roche); RPI-3121 (inhibidor de peptidilproteasa, 1-[3(S)-3-(n- α -benciloxi-carbonil)-1-asparginil]-amino-2-hidroxi-4-fenilbutiril]-n-terc-butil-1-prolinamida); 2720 (6-cloro-3,3-dimetil-4-(isopropeniloxycarbonil)-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)tione); SC-52151 (inhibidor de proteasa de isómero de hidroxietilurea) (G. D. Searle); SC-55389A (inhibidor de proteasa de isómero de hidroxietilurea) (G. D. Searle); TIBO R82150 ((+)-(5S)-4,5,6,7-tetrahidro-5-metil-6-(3-metil-2-butenil)-imidazo[4,5,1-jk]-[1,4]-benzodiazepin-2(1H)-tione) (Janssen Pharmaceuticals); TIBO 82913 ((+)-(5S)-4,5,6,7-tetrahidro-9-cloro-5-metil-6-(3-metil-2-butenil)imidazo[4,5,1-jk]-[1,4]-benzo-diazepin-2(1H)-tione) (Janssen Pharmaceuticals); TSAO-m3T ([2',5'-bis-O-(terc-butildimetilsilil)-3'-espiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxatiol-2',2'-dióxido)]- β -D-pentofuranosil-N3-metil-timina); U90152 (1-[3-[(1-metiletil-amino)-2-piridinil]-4-[[5-[(metilsulfonil)-amino]-1H-indol-2-il]-carbonil]-piperacina); UC (derivados de tiocarboxanilida) (Uniroyal); UC-781 (N-[4-cloro-3-(3-metil-2-buteniloxi)fenil]-2-metil-3-furanocarbotoamida); UC-82 (N-[4-cloro-3-(3-metil-2-buteniloxi)fenil]-2-metil-3-tiofenocarbotoamida); VB 11,328 (inhibidor de proteasa de hidroxietilsulfonamida) (Vertex/Glaxo Wellcome); XM 323 (inhibidor de proteasa de urea cíclica) (Dupont Merck); y penciclovir. En otra realización más, el compuesto indólico de la invención se administra en combinación con el inhibidor de proteasa LG1350.

Los siguientes fármacos se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos de la presente invención.

Nombre del Fármaco	Fabricante
3TC, lamivudina marca Epivir®	GlaxoSmithKline
abacavir genérico Ziagen®, ABC o 1592U89	GlaxoSmithKline

Nombre del Fármaco	Fabricante
<u>ABC</u> , abacavir marca Ziagen® o 1592U89	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>ABT-378/r</u> o lopinavir/ritonavir marca Kaletra®	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>AG-1549</u> , <i>S-1153 o capravirina (CPV)</i>	<u>Pfizer</u>
<u>AG1661</u> , <i>Inmunógeno de HIV marca Remune® o vacuna Salk</i>	<u>Immune Response Corp.</u>
<u>amprenavir</u> (APV) marca Agenerase®, 141W94 o VX-478	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>aldesleuquina</u> genérica <i>Proleukin® o Interleuquina 2 (IL-2)</i>	<u>Chiron Corporation</u>
<u>amprenavir</u> genérico Agenerase®, APV, 141W94 o VX-478	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>Aptivus®</u>	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>APV</u> , amprenavir marca Agenerase®, 141W94 o VX-478	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>atazanavir</u> genérico Reyataz™ o BMS-232632	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>Atripla®</u>	<u>Bristol-Myers Squibb y Gilead</u>
<u>AZT</u> , zidovudina (ZDV) marca Retrovir®	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>Bis(POC) PMPA</u> , tenofovir marca Viread® DF	<u>Gilead Sciences</u>
<u>BMS-232632</u> o atazavir marca Reyataz™	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>BMS-56190</u> o <i>DPC-083</i>	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>calanolida A</u>	<u>Sarawak Medichem</u>
<u>capravirina (CPV)</u> , <i>AG-1549 o S-1153</i>	<u>Pfizer</u>
<u>zidovudina</u> marca Combivir® + lamivudina o AZT + 3TC	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>CPV (capravirina)</u> , <i>AG-1549 o S-1153</i>	<u>Pfizer</u>
<u>indinavir</u> (IDV) marca Crixivan® o MK-639	<u>Merck & Co.</u>
<u>d4T</u> , estavudina marca Zerit® o BMV-27857	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>DAPD</u> o <i>amdoxovir</i>	<u>Gilead Sciences</u>
<u>ddC</u> o zaltabina marca Hivid®	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>ddl</u> , didanosina marca Videx® o BMV-40900	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>delavirdina</u> genérica Rescriptor®, DLV o U-90152S/T	<u>Pfizer</u>
<u>didanosina</u> genérica Videx®, ddl o BMV-40900	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>DLV</u> , delvirdina marca Rescriptor® o U-90152S/T	<u>Pfizer</u>
<u>DGP-083</u> o <i>BMS-56190</i>	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>hidroxiurea (HU)</u> marca Droxia®	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>efavirenz</u> genérico Sustiva® o EFV	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>EFV</u> , efavirenz marca Sustiva®	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>emtricitabina</u> genérica <i>Emtriva™ o FTC</i>	<u>Gilead Sciences</u>
<u>emtricitabina</u> marca Emtriva® o FTC	<u>Gilead Sciences</u>
<u>enfuvirtida</u> genérica Fuzeon™ o T-20	<u>Trimeris y Hoffmann-La Roche</u>
<u>lamivudina</u> marca Epivir® o 3TC	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>epoetina α</u> (eritropoyetina) genérico Procrit®	<u>Ortho Biotech</u>
<u>Epzicom®</u>	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>eritropoyetina</u> (epoetina α) genérica Procrit®	<u>Ortho Biotech</u>
<u>saquinavir</u> marca Fortovase® (Cápsula de gelatina blanda) o SQV (SGC)	<u>Hoffmann-La Roche</u>

Nombre del Fármaco	Fabricante
<u>fosamprenavir</u> o GW-433908 o VX-175	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>FTC</u> o <u>emtricitabina</u> marca <u>Emtriva</u> ®	<u>Gilead Sciences</u>
<u>enfuvirtida</u> marca <u>Fuzeon</u> ™ o T-20	<u>Trimeris and Hoffmann-La Roche</u>
<u>GW-433908</u> o <u>fosamprenavir</u> o VX-175	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>HE2000</u> o α - <u>epibromida</u>	<u>HollisEden Pharmaceuticals</u>
<u>Inmunógeno de HIV-1</u> genérico <u>Remune</u> ®, <u>vacuna Salk</u> o AG1661	<u>Immune Response Corp.</u>
<u>zalcitabina</u> marca <u>Hivid</u> ® o ddC	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>HU</u> o <u>hidroxiurea</u> marca <u>Droxia</u> ®	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>hidroxiurea</u> genérica <u>Droxia</u> ® o HU	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>IDV</u> , <u>indinavir</u> marca <u>Crixivan</u> ® o MK-639	<u>Merck & Co.</u>
<u>IL-2</u> (<u>Interleuquina 2</u>) o <u>aldesleuquina</u> marca <u>Proleukin</u> ®	<u>Chiron Corporation</u>
<u>indinavir</u> genérico <u>Crixivan</u> ®, <u>IDV</u> o MK-639	<u>Merck & Co.</u>
<u>Interleuquina 2</u> (IL-2) o <u>aldesleuquina</u> marca <u>Proleukin</u> ®	<u>Chiron Corporation</u>
<u>raltegravir</u> marca <u>Isentress</u>	<u>Merck</u>
<u>saquinavir</u> marca <u>Invirase</u> ® (Cápsula de gelatina dura), <u>SQV</u> (HGC) o Ro-31-8959	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>lopinavir/ritonavir</u> marca <u>Kaletra</u> ® o ABT-378/r	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>laminuvina</u> genérica <u>Epivir</u> ® o 3TC	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>Lexiva</u> ®	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>lopinavir/ritonavir</u> genérico <u>Kaletra</u> ® o ABT-378/r	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>MK-639</u> , <u>indinavir</u> (IDV) marca <u>Crixivan</u> ®	<u>Merck & Co.</u>
<u>nelfinavir</u> genérico <u>Viracept</u> ®, <u>NFV</u> o AG-1343	<u>Pfizer</u>
<u>nevirapina</u> genérica <u>Viramune</u> ®, <u>NVP</u> o BI-RG-587	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>NFV</u> , <u>nelfinavir</u> marca <u>Viracept</u> ® o AG-1343	<u>Pfizer</u>
<u>ritonavir</u> (RTV) marca <u>Norvir</u> ® o ABT-538	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>NVP</u> , <u>nevirapina</u> marca <u>Viramune</u> ® o BI-RG-587	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>PNU-140690</u> o <u>tipranavir</u>	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>Prezista</u> ®	<u>Tibotec</u>
<u>PRO-542</u>	<u>Progenies Pharmaceuticals</u>
<u>epoetina α</u> (eritropoyetina) marca <u>Procrit</u> ®	<u>Ortho Biotech</u>
<u>aldesleuquina</u> marca <u>Proleukin</u> ® o <u>Interleuquina-2</u> (IL-2)	<u>Chiron Corporation</u>
<u>Inmunógeno de HIV-1</u> <u>Remune</u> ® o <u>vacuna Salk</u>	<u>Immune Response Corp.</u>
<u>delavirdina</u> (DLV) marca <u>Rescriptor</u> ® o U-90152S/T	<u>Pfizer</u>
<u>zidovudina</u> (ZDV) marca <u>Retrovir</u> ® o AZT	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>atazanavir</u> marca <u>Reyataz</u> ™ o BMS-232632	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>ritonavir</u> genérico <u>Norvir</u> ®, <u>RTV</u> o ABT-538	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>RTV</u> , <u>ritonavir</u> marca <u>Norvir</u> ® o ABT-538	<u>Abbott Laboratories</u>
<u>vacuna Salk</u> , <u>Inmunógeno de HIV-1</u> marca <u>Remune</u> ® o AG1661	<u>Immune Response Corp.</u>
<u>saquinavir</u> (Cápsula de gelatina dura) genérico <u>Invirase</u> ®, <u>SQV</u> (HGC) o Ro-31-8959	<u>Hoffmann-La Roche</u>

Nombre del Fármaco	Fabricante
<u>sagüinavir</u> (Cápsula de gelatina blanda) genérico Fortovase® o SQV (SGC)	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>SCH-C</u>	<u>Schering-Plough</u>
<u>maraviroc</u> marca Selzentry	<u>Pfizer</u>
<u>somatropina</u> marca Serostim®	<u>Serono Laboratories</u>
<u>somatropina</u> genérica Serostim®	<u>Serono Laboratories</u>
<u>SQV</u> (HGC), <u>sagüinavir</u> marca Invirase® (Cápsula de gelatina dura) o Ro-31-8959	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>SQV</u> (SGC) o <u>sagüinavir</u> marca Fortovase® (Cápsula de gelatina blanda)	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>estavudina</u> genérica Zerit®, d4T o BMV-27857	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>efavirenz</u> (EFV) marca Sustiva®	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>T-1249</u>	<u>Trimeris y Hoffmann-La Roche</u>
<u>T-20</u> o efuvirtida marca Fuzeon™	<u>Trimeris y Hoffmann-La Roche</u>
<u>TDF</u> , tenofovir DF genérico Viread™ o Bis(POC) PMPA	<u>Gilead Sciences</u>
<u>tenofovir DF</u> (TDF) genérico Viread®, Bis(POC) PMPA	<u>Gilead Sciences</u>
<u>tipranavir</u> o PNU-1406090	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>TMC-114</u>	<u>Tibotec-Virco Group</u>
<u>TMC-125</u>	<u>Tibotec-Virco Group</u>
<u>abacavir</u> marca Trizivir® + zidovudina + lamivudina (ABC + AZT + 3TC)	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>Truvada®</u>	<u>Gilead</u>
<u>didanosina</u> marca Videx®, ddI o BMV-40900	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>didanosina</u> (ddI) marca Videx®EC: cápsulas de liberación retardada	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>nelfinavir</u> (NFV) marca Viracept® o AG-1343	<u>Pfizer</u>
<u>nevirapina</u> (NVP) marca Viramune® o BI-RG-587	<u>Boehringer Ingelheim</u>
<u>tenofovir DF</u> marca Viread® o Bis(POC) PMPA	<u>Gilead Sciences</u>
<u>VX-175</u> o <u>fosamprenavir</u> o GW-433908	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>zalcitabina</u> genérica Hivid® o ddC	<u>Hoffmann-La Roche</u>
<u>ZDV</u> , zidovudina marca Retrovir® o AZT	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>estavudina</u> marca Zerit®, d4T o BMV-27857	<u>Bristol-Myers Squibb</u>
<u>abacavir</u> (ABC) marca Ziagen® o 1592U89	<u>GlaxoSmithKline</u>
<u>zidovudina</u> genérica Retrovir®, AZT o ZDV	<u>GlaxoSmithKline</u>

Fármacos adicionales que se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos de la presente invención incluyen:

GW5634 (GSK)	MIV-150 (Medivir/Chiron)	Tipranavir (B-I)
RO033-4649 (Roche)	TMC125 (Tibotec)	
GW640385 (GSK/Vertex)	TMC114 (Tibotec)	
Elvucitabine (Achillion Ph.)	Alovudine (FLT) (B-I)	
MIV-210 (GSK/Medivir)	Racivir (Pharmasset)	
SPD754 (Shire Pharm.)	Reverser (Incyte Corp.)	
FP21399 (Fuji Pharm.)	AMD070 (AnorMed)	

GW873140 (GSK)	BMS-488043 (BMS)	
Schering C/D (417690)	PRO 542 (Progenies Pharm)	
	TAK-220 (Takeda)	
	TNX-355 (Tanox)	
	UK-427,857 (Pfizer)	

Los siguientes fármacos se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos de la presente invención.

Nombre Comercial	Nombre Genérico	Uso	Nombre del Fabricante
Abelcet, Ambisome	Amfotericina B, ABLC	antifúngico para aspergilosis	varios
Bactrim, Septra	sulfametoxazol y trimetoprim	antibiótico antiprotzoario para tratamiento y prevención de neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	varios
Biaxin, Klacid	claritromicina	antibiótico para prevención y tratamiento de <i>Mycobacterium avium</i>	Abbott Laboratories
Cytovene	ganciclovir, DHPG	antiviral para retinitis por CMV	Roche
DaunoXome	daunorrubicina-liposómica	quimioterapia para el sarcoma de Kaposi	Gilead
Diflucan	fluconazol	antifúngico para candidiasis, meningitis criptocócica	Pfizer
Doxil	hidrocloruro de doxorubicina-liposómico	quimioterapia para el sarcoma de Kaposi	Ortho Biotech
Famvir	famciclovir	antiviral para herpes	Novartis
Foscarnet	foscavir	antiviral para herpes, retinitis por CMV	Astra Pharmaceuticals
Gamimune N	inmunoglobulina, gammaglobulina, IGIV	refuerzo inmunitario para prevenir infecciones bacterianas en niños	Bayer Biologicals
Intron A	interferón α -2b	sarcoma de Kaposi, hepatitis C	Schering
Marinol	dronabinol	tratamiento de la pérdida de apetito	Roxane Laboratories
Megace	acetato de megestrol	tratamiento del apetito, pérdida de peso	Bristol Myers-Squibb
Mepron	atovacuna	antibiótico antiprotzoario para tratamiento y prevención de neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	GlaxoSmithKline
Mycobutin, Ansamycin	rifabutina	antibiótico antimicobacteriano para la prevención de <i>Mycobacterium avium</i>	Adria Pharmaceuticals
NebuPent	pentamidina	antibiótico antiprotzoario para la prevención de neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	Fujisawa
Neutrexin	glucuronato de trimetrexato y leucovorina	antibiótico antiprotzoario para el tratamiento de neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	MedImmune
Panretin gel	gel de alitretinoína al 0,1 %	sarcoma de Kaposi relacionado con el sida	Ligand Pharmaceuticals
Procrit, Epogen	eritropoyetina, EPO	tratamiento de la anemia relacionada con terapia con AZT	Amgen

Nombre Comercial	Nombre Genérico	Uso	Nombre del Fabricante
Roferon A	interferón α -2a	sarcoma de Kaposi y hepatitis C	Roche
Serostim	rDNA de somatropina	tratamiento de la pérdida de peso	Serono
Sporanox	itraconazol	antifúngico para blastomycosis, histoplasmosis, aspergilosis y candidiasis	Janssen Pharmaceuticals
Taxol	paclitaxel	sarcoma de Kaposi	Bristol Myers-Squibb
Valcyte	valganciclovir	antiviral para retinitis por CMV	Roche
Vistide	cidofovir, HPMPC	antiviral para retinitis por CMV	Gilead
Vitrasert	inserción de ganciclovir	antiviral para retinitis por CMV	Bausch & Lomb
Vitravene intravitreal injectable	inyección de fomivirsen sódico	antiviral para retinitis por CMV	Isis Pharmaceuticals
Zithromax	azitromicina	antibiótico para Mycobacterium avium	Pfizer

Se pueden usar productos que se ha permitido que avancen como Investigational New Drugs (IND) (productos en fase de investigación clínica) por la FDA para el tratamiento de complicaciones de la infección por HIV y el sida. Los siguientes fármacos se pueden usar en combinación y/o alternancia con los compuestos de la presente invención.

- 5
 - Glucuronato de trimetrexato para el tratamiento de neumonía por Pneumocystis carinii en pacientes con sida que no pueden tolerar formas de tratamiento estándar.
 - Ganciclovir para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus en pacientes con sida.
 - Pentamidina aerosolizada para la prevención de neumonía por Pneumocystis carinii en pacientes con sida.
 - Eritropoyetina para el tratamiento de anemia relacionada con zidovudina.
 - 10
 - Atovacuona para el tratamiento de pacientes con sida con neumonía por Pneumocystis carinii que son intolerantes o insensibles a trimetoprim-sulfametoxazol.
 - Rifabutina para la profilaxis contra bacteremia compleja por Mycobacterium avium en pacientes con sida.
 - Cidofovir intravenoso Vistide para personas infectadas con HIV con retinitis por citomegalovirus (CMV) recurrente que ha progresado a pesar del tratamiento (Hoffmann-La Roche).
 - 15
 - Serostim, una hormona de crecimiento humana recombinante derivada de mamíferos, para el tratamiento de la caquexia relacionada con el sida (Serono Laboratories).
- En realizaciones particulares, los compuestos divulgados en la presente memoria se pueden administrar en combinación o alternancia con uno, dos o más de otros agentes anti-HIV. En una subrealización, el agente adicional se selecciona de:
- 20
 - un inhibidor de proteasa seleccionado opcionalmente de amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir (incluyendo mesilato de saquinavir), lopinavir, ritonavir, fosamprenavir, darunavir, atazanavir (incluyendo la sal de sulfato) y nelfinavir (incluyendo la sal de mesilato);
 - un inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídico o nucleotídico seleccionado opcionalmente de lamivudina, emtricitabina, abacavir, zalcitabina, zidovudina, tenofovir (incluyendo disoproxilfumarato de tenofovir), didanosina, y estavudina;
 - 25
 - un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico seleccionado opcionalmente de delavirdina, efavirenz y nevirapina;
 - una combinación de dosis fijas de Atripla, Combivir, Trizivir y Truvada;
 - un inhibidor de la entrada (tal como un inhibidor de la fusión o un antagonista del correceptor CCR5) seleccionado opcionalmente de maraviroc y enfuvirtida; y
 - 30
 - un inhibidor de integrasa tal como raltegravir (MK-0518) o elvitegravir (GS-9137).

Cuando se usa un agente anti-HIV adicional, opcionalmente puede estar en otra forma, tal como una sal, un solvato,

un hidrato, una forma de profármaco, un polimorfo, un enantiómero y similares. El agente anti-HIV adicional también se puede seleccionar de:

un inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídico seleccionado opcionalmente de amdoxovir, apricitabina, y elvucitabina;

5 un inhibidor de proteasa que es opcionalmente brecanivir o GS-8374;

un antagonista del receptor CCR5 seleccionado opcionalmente de Aplaviroc, PR02000 y Vicriviroc;

un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico que es opcionalmente Etravirine (TMC-125), Rilpivirine (TMC-278) o Calanolide A;

un inhibidor de integrasa que es opcionalmente Elvitegravir, GSK-364735 o raltegravir; y

10 un inhibidor de la maduración que es opcionalmente Bevirimat (PA457);

un inhibidor celular, tal como hidroxiurea;

un inhibidor de la entrada, tal como vicriviroc o TNX-355; y

un inhibidor inmunobasado tal como Immunitin (α -epibromida), proleuquina (IL-2), Remune (inmunógeno de HIV-1), BAY 50-4798 o IR103.

15 Agentes metabolizados por citocromo P450

En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado en la presente memoria se puede administrar en combinación o alternancia con un agente farmacéuticamente aceptable que es metabolizado por citocromo P450 monooxigenasa. Citocromo P450 monooxigenasas útiles ejemplares incluyen citocromo P450 2C8, citocromo P450 2C9 y citocromo P450 3A4. En ciertas realizaciones, los compuestos puros proporcionados en la presente memoria pueden inhibir citocromo P450 monooxigenasas mejorando de ese modo la farmacocinética del agente coadministrado. En realizaciones particulares, la isozima P450 inhibida es CYP3A4. En realizaciones particulares, el compuesto fosfoindólico se administra en combinación con un segundo compuesto anti-HIV sin la necesidad de un refuerzo de ritonavir. En realizaciones particulares, el compuesto fosfoindólico se administra en combinación con uno o más de Atazanavir, Fosamprenavir, Darunavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Saquinavir, Tipranavir o Enfuvirtide.

25 En realizaciones particulares, el compuesto fosfoindólico se administra en una terapia de combinación con uno o más inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos y/o uno o más inhibidores de integrasa.

El agente farmacéuticamente aceptable que es metabolizado por citocromo P450 monooxigenasa puede ser cualquiera de tales agentes conocido o identificado por los expertos en la especialidad. Compuestos no limitativos ejemplares que pueden ser metabolizados por citocromo P450 monooxigenasa incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, torsemida, amodiaquina, cerivastatina y repaglinida (citocromo P450 2C8); ciertos NSAID (p. ej., diclofenac, ibuprofeno, lornoxicam, meloxicam, S-naproxeno, piroxicam, suprofen), ciertos agentes hipoglucémicos orales (p. ej., tolbutamida, glipizida), ciertos bloqueadores de angiotensina II (p. ej., losartán, irbesartán), ciertas sulfonilureas (p. ej., gliburida, glibenclamida, glipizida, glimepirida, tolbutamida, amitriptilina), celecoxib, fluoxetina, fluvastatina, gliburida, nateglinida, fenitoína, rosiglitazona, tamoxifeno, torsemida, S-warfarina (citocromo P450 2C9); ciertos antibióticos macrólidos (p. ej., claritromicina, eritromicina, telitromicina), ciertos antiarrítmicos (p. ej., quinidina), ciertas benzodiazepinas (p. ej., alprazolam, diazepam, midazolam, triazolam), ciertos moduladores inmunitarios (ciclosporina, tacrolimus), ciertos antivirales para HIV (p. ej., indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir), ciertos procinéticos (p. ej., cisaprida), ciertas antihistaminas (p. ej., astemizol, clorfeniramina, terfenidina), ciertos bloqueadores de canales del calcio (p. ej., amlodipino, diltiazem, felodipino, lercanidipino, nifedipino, nisoldipino, nitrendipino, verapamilo), ciertos inhibidores de HMG CoA reductasa (p. ej., atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, simvastatina), ciertos esteroides (estradiol, hidrocortisona, progesterona, testosterona), alfentanilo, aprepitant, aripiprazol, buspirona, cafergot, cafeína=>TMU, cilostazol, cocaína, N-desmetilación de codeína, dapsona, dexametasona, dextrometorfano, docetaxel, domperidona, eplerenona, fentanilo, finasterida, gleevec, haloperidol, irinotecano, LAAM, lidocaína, metadona, nateglinida, odanestrona, pimozida, propranolol, quetiapina, quinina, risperidona, rosuvasatrina NOT, salmeterol, sildenafil, sirolimus, tamoxifeno, taxol, terfenadina, trazodona, vincristina, zaleplona, ziprasidona, zolpidem (citocromo P450 3A4). En realizaciones particulares, se proporcionan en la presente memoria métodos en combinación o alternancia con antivirales para HIV que son metabolizados por citocromo P450 (p. ej., indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir).

50 Compuestos ejemplares adicionales que pueden ser metabolizados por citocromo P450 monooxigenasa incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de CCR5 (p. ej., PRO-140, viciviroc o SCH-417,690, y maraviroc o UK-427,857), inhibidores de integrasa (p. ej. JTK-303/GS-9137, ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(2S)-1-hidroxi-3-metilbutan-2-il]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, MK-0518, 5-(1,1-dioxido-1,2-tiacinan-2-il)-N-(4-fluorobencil)-8-hidroxi-1,6-naftiridin-7-carboxamida, y los descritos en las Patentes de EE. UU N° 6.924.282, 6.921.759, 6.919.351, 6.841.558, 6.541.515, 6.403.347, 6.395.743, 6.380.249, 6.306.891, 6.271.402, 6.262.055, 6.245.806, 6.124.327,

6.110.716, 5.939.414, 5.858.738, 5.759.842, 7.176.220 y 7.112.600, cuyos contenidos son incorporados por la presente mediante referencia en su totalidad), inhibidores de proteasa (p. ej., saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, amprenavir y darunavir), inhibidores de la fusión (p. ej., enfurvitida), inhibidores de la maduración (p. ej., bevirimat o PA-457) e inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos (p. ej. zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, enofovir, emtricitabina, combivir, trizivir, truvada y epi-com).

Compuestos ejemplares adicionales que pueden ser metabolizados por citocromo P450 monooxigenasa incluyen, pero no se limitan a, ritonavir, los inmunosupresores ciclosporina, FK-506 y rapamicina, los agentes quimioterapéuticos taxol y taxotere, el antibiótico claritromicina y los inhibidores de proteasa de HIV A-77003, A-80987, MK-639, saquinavir, VX-478, AG1343, DMP-323, XM-450, BILA 2011 BS, BILA 1096 BS, BILA 2185 BS, BMS 186,318, LB71262, SC-52151, SC-629 (*N,N*-dimetilglicil-*N*-(2-hidroxi-3-(((4-metoxifenil)sulfonil)(2-metilpropil)amino)-1-(fenilmetil)propil)-3-metil-L-valinamida), KNI-272, CGP 53437, COP 57813 y U-103017.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos para el uso en métodos para mejorar la farmacocinética de un inhibidor de proteasa de HIV (o una de sus sales farmacéuticamente aceptables) que es metabolizado por citocromo P450 monooxigenasa. Los métodos comprenden administrar el inhibidor de proteasa de HIV en combinación o alternancia con un compuesto descrito en la presente memoria. Tal combinación o alternancia puede ser útil para inhibir proteasa de HIV en seres humanos y también puede ser útil para la inhibición, el tratamiento o la profilaxis de una infección por HIV o sida en seres humanos. El inhibidor de proteasa de HIV puede ser cualquier inhibidor de proteasa de HIV conocido por los expertos en la especialidad. En ciertas realizaciones, el inhibidor de proteasa de HIV es amprenavir (Agenerase, GlaxoSmithKline), tipranavir (Aptivus, Boehringer Ingelheim), indinavir (Crixivan, Merck), saquinavir (Fortovase, Hoffmann-La Roche), mesilato de saquinavir (Invirase, Hoffmann-La Roche), lopinavir y ritonavir (Kaletra, GlaxoSmithKline), ritonavir (Norvir, Abbott), darunavir (Prezista, Tibotec), sulfato de atazanavir (Reyataz) o mesilato de nelfinavir (Viracept, Agouron) o una de sus combinaciones.

En subrealizaciones particulares, los compuestos divulgados en la presente memoria se pueden administrar en combinación o alternancia con uno, dos o más de otros agentes anti-HIV inhibidores de proteasa o inhibidores de integrasa que potencialmente pueden mejorar el metabolismo del segundo agente. En una subrealización, el agente adicional se selecciona de:

un inhibidor de proteasa seleccionado opcionalmente de amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir (incluyendo mesilato de saquinavir), lopinavir, ritonavir, fosamprenavir, darunavir, atazanavir (incluyendo la sal de sulfato), nelfinavir (incluyendo la sal de mesilato), brecanivir o GS-8374; y

un inhibidor de integrasa tal como raltegravir (MK-0518) o elvitegravir (GS-9137) o GSK-364735.

En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada agente se administra en serie. Durante la terapia de combinación, se administran conjuntamente dosificaciones eficaces de dos o más agentes. Las dosificaciones administradas dependen de factores tales como la absorción, la biodistribución, el metabolismo y las velocidades de excreción de cada fármaco así como otros factores conocidos por los expertos en la especialidad. Se ha de apuntar que las cantidades de dosificación variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar, la edad, el peso y el estado físico general del sujeto que recibe el fármaco. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, se deben ajustar a lo largo del tiempo regímenes y esquemas de dosificación específicos según la respuesta del sujeto al fármaco, las necesidades del sujeto y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones. Ejemplos de intervalos de dosificación adecuados para los compuestos, incluyendo derivados nucleosídicos tales como, por ejemplo, D4T, DDI y 3TC, nucleósidos ramificados en 2' o inhibidores de proteasa como nelfinavir e indinavir, se pueden encontrar en la literatura científica y Physicians' Desk Reference. Intervalos sugeridos para dosificaciones eficaces de los compuestos de la presente invención son solo orientaciones, y no pretenden limitar el alcance o el uso de la invención.

El régimen de combinación y alternancia divulgado puede ser útil en el tratamiento y la prevención de infecciones retrovirales y otras afecciones relacionadas, tales como, por ejemplo, complejo relacionado con el sida (ARC, por sus siglas en inglés), linfadenopatía generalizada persistente (PGL, por sus siglas en inglés), afecciones neurológicas relacionadas con el sida, afecciones por positivas a la posición de anticuerpos anti-HIV y a HIV, sarcoma de Kaposi, trombocitopenia púrpura e infecciones oportunistas. Además, estos compuestos o formulaciones se pueden usar profilácticamente para prevenir o retardar la progresión de una dolencia clínica en individuos que son positivos a anticuerpos anti-HIV o antígenos de HIV o que se han expuesto a HIV.

Ensayos

Los compuestos proporcionados en la presente memoria se pueden ensayar con respecto a la actividad contra HIV o infección por HIV en cualquier ensayo considerado adecuado por un experto en la especialidad. Ensayos ejemplares incluyen los descritos en esta sección y los proporcionados en los Ejemplos posteriores.

Sistemas de cultivo celular para determinar actividades antivirales

Esquemas de detección de productos amplificados

Detección heterogénea: La transferencia Southern, por ejemplo, es una técnica de detección heterogénea. En la transferencia Southern, se usa electroforesis para separar productos de amplificación por tamaño y carga. Los productos fraccionados por tamaño se transfieren a una membrana o un filtro mediante difusión, puesta a vacío o electrotransferencia. Sondas de detección marcadas se hibridan a las dianas unidas a la membrana en solución, los
5 filtros se lavan para retirar cualquier sonda no hibridada y la sonda hibridada sobre la membrana se detecta mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la especialidad.

Otros tipos de detección heterogénea se basaban en la captura específica de los productos de amplificación por medio de enzimoanálisis de adsorción (ELISA). Un método usado con PCR implica marcar un cebador con un hapteno o ligando, tal como biotina, y, después de la amplificación, capturarlo con una microplaca revestida con
10 un anticuerpo o estreptavidina. El otro cebador se marca con un informador tal como fluoresceína, y la detección se consigue añadiendo un anticuerpo antifluoresceína tal como un conjugado de peroxidato de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). Este tipo de método no es tan específico como usar sondas de detección que se hibridan a productos de amplificación definidos de interés.

El sistema de sondeo LCx (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y la prueba Amplicor HIV-1 (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA) son sistemas que usan métodos de detección heterogéneos. En el sistema LCx, sondas oligonucleotídicas marcadas con hapteno se someten a termociclos en la reacción en cadena de la ligasa. Bien un hapteno de captura o bien un hapteno de detección se liga covalentemente a cada uno de los cuatro oligonucleótidos del cebador. Con la amplificación, cada producto amplificado (amplicón) tiene un hapteno de
15 captura y un hapteno de detección. Cuando se completa la amplificación, el instrumento del sistema LCx transfiere la reacción a un nuevo pocillo en el que las micropartículas revestidas con anticuerpo se unen al hapteno de captura. A continuación, cada micropartícula se une irreversiblemente a una matriz de fibra de vidrio. Una etapa de lavado retira de la micropartícula cualquier sonda que contenga solo el hapteno de detección. El instrumento de LCx añade un conjugado de fosfatasa alcalina (AP)-anticuerpo que se une al hapteno de detección. Un sustrato fluorogénico para AP es el 4-metilumbeliferilo. La desfosforilación del 4-metilumbeliferilo mediante AP lo convierte en 4-
20 metilumbeliferona, que es fluorescente.

La prueba Amplicor HIV-1 usa un formato de ELISA. Después de la amplificación mediante PCR, el amplicón se desnaturaliza químicamente. Sondas oligonucleotídicas específicas para el amplicón capturan las hebras desnaturalizadas sobre una microplaca revestida. El operario elimina por lavado cualesquiera cebadores no incorporados y material no hibridado en una etapa de lavado y a continuación añade un conjugado de avidina-HRP a
25 cada pocillo. El conjugado se une al amplicón marcado con biotina capturado sobre la placa. Posteriormente, el operario añade 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), un sustrato de HRP cromogénico. Cuando está presente peróxido de hidrógeno, la HRP oxida la TMB. La señal se determina colorimétricamente.

Detección homogénea: puesto que las sondas de detección hibridadas y no hibridadas no se separan físicamente en sistemas homogéneos, estos métodos requieren menos etapas que los métodos heterogéneos y así son menos propensos a la contaminación. Entre los estuches ("kits") disponibles comercialmente que usan detección homogénea de marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes están el sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), el sistema BDProbeTecET (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), QPCR System 5000 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) e Hybridization Protection Assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA).
35

El sistema TaqMan detecta el amplicón en tiempo real. La sonda de detección, que se hibrida a una región dentro del amplicón, contiene una fluorsonda donante tal como fluoresceína en su extremo 5' y un resto extintor tal como rodamina en su extremo 3'. Cuando tanto el extintor como el fluoróforo están en el mismo oligonucleótido, se inhibe la fluorescencia del donante. Durante la amplificación la sonda se une a la diana. La polimerasa de Taq desplaza y escinde la sonda de detección a medida que sintetiza la hebra de sustitución. La escisión de la sonda de detección da como resultado la separación del fluoróforo del extintor, conduciendo a un incremento en la señal de
40 fluorescencia del donante. Durante cada ciclo de amplificación, el proceso se repite. La cantidad de señal fluorescente se incrementa a medida que se incrementa la cantidad de amplicón.

Las balizas moleculares también usan extintores y fluoróforos. Las balizas son sondas que son complementarias al amplicón diana, pero contienen tramos cortos (aproximadamente 5 nucleótidos) de oligonucleótidos complementarios en cada extremo. Los extremos 5' y 3' de las balizas están marcados con un fluoróforo y un extintor, respectivamente. Se forma una estructura de horquilla cuando la baliza no se hibrida a una diana, poniendo en contacto el fluoróforo y el extintor y dando como resultado extinción fluorescente. La región del bucle contiene la región complementaria al amplicón. Con la hibridación a una diana, la estructura de horquilla se abre y el extintor y el fluoróforo se separan, permitiendo el desarrollo de una señal fluorescente. Un fluorómetro mide la señal en tiempo real.
50

El sistema BDProbeTecET usa un método de detección en tiempo real que combina aspectos del TaqMan y las balizas moleculares. La sonda tiene una estructura de bucle en horquilla y contiene marcadores de fluoresceína y rodamina. Sin embargo, en este sistema, la región complementaria a la molécula diana no está dentro del bucle sino en cambio en la región 3' con respecto al marcador de rodamina. En lugar de contener la secuencia complementaria a la diana, el bucle de una sola hebra contiene un sitio de restricción para la enzima de restricción BsoBI. La secuencia de una sola hebra no es un sustrato para la enzima. Los marcadores de fluoresceína y rodamina están
55 60

cerca uno de otro antes de la amplificación, lo que extingue la fluorescencia de la fluoresceína. La amplificación por desplazamiento de la hebra convierte la sonda en una molécula de doble hebra. La enzima de restricción BsoBI puede escindir la molécula, dando como resultado la separación de los marcadores y un incremento en la señal fluorescente.

- 5 El QPCR System 5000 emplea electroquimioluminiscencia con marcadores de rutenio. Se usa un cebador biotinilado. Después de la amplificación, los productos de biotina se capturan sobre cuentas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. Las cuentas se transfieren a una célula de flujo electroquímica mediante aspiración y se mantienen magnéticamente en la superficie del electrodo. Con la estimulación eléctrica, la sonda marcada con rutenio emite luz.
- 10 El Hybridization Protection Assay se usa en ensayos de PACE no amplificados de Gen-Probe así como en ensayos de *M. tuberculosis* y *C. trachomatis* amplificados. Las sondas oligonucleotídicas de detección en HPA se marcan con éster de acridinio (AE, por sus siglas en inglés) quimioluminiscente por medio de un brazo conector. La hibridación tiene lugar durante 15 minutos a 60°C en el mismo tubo en el que se producía la amplificación. El reactivo de selección, una solución tamponada suavemente básica añadida después de la hibridación, hidroliza el AE en cualquier sonda no hibridada, volviéndola no quimioluminiscente. El AE sobre sondas hibridadas se pliega dentro de la hendidura menor de la doble hélice, protegiéndose de ese modo de la hidrólisis por el reactivo de selección. El AE emite una señal quimioluminiscente durante la hidrólisis por peróxido de hidrógeno seguida por hidróxido sódico. Un luminómetro registra la señal quimioluminiscente durante 2 segundos (un período denominado "apagado") y presenta los fotones emitidos desde el punto de vista de unidades de luz relativas (RLU, por sus siglas en inglés).
- 20 El diseño de la sonda de detección es crítico en todas las metodologías que usan sondas que detectan productos de amplificación. Las buenas sondas de detección se hibridan solo a productos de amplificación especificados y no se hibridan a productos no específicos. Otros puntos clave para optimizar las metodologías de detección implican el marcaje de sondas y la maximización del rendimiento de la muestra.
- 25 Métodos de marcaje y moléculas informadoras. Las sondas de detección se pueden marcar de varios modos diferentes. La incorporación enzimática de ³²P o ³⁵S en las sondas es el método más común para el marcaje isotópico. Después de la hibridación y el lavado, la señal se detecta sobre película autorradiográfica.

Para realizar la detección no radiactiva, las sondas se pueden marcar enzimáticamente con una variedad de moléculas. La biotina se puede incorporar enzimáticamente y a continuación detectarse con fosfatasa alcalina conjugada a estreptavidina usando sustratos para AP como fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, por sus siglas en inglés) y nitroazul tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés). Sustratos quimioluminiscentes tales como Lumi-Phos 530 o Lumi-Phos Plus (Lumigen, Southfield, MI) también se pueden usar con la AP. Además, digoxigenina-11-dUTP se puede incorporar enzimáticamente en DNA o RNA, y se pueden usar conjugados de antidigoxigenina-AP con detección colorimétrica o quimioluminiscente.

- 30 Hay otros numerosos tipos de moléculas informadoras incluyendo restos quimioluminiscentes como ésteres de acridinio. También están disponibles muchos restos fluorescentes. También se pueden usar compuestos electroquimioluminiscentes tales como tris(2,2'-bipiridina)rutenio (II). Exposiciones adicionales de estas técnicas y similares se pueden encontrar en Schiff et al., Semin. Liver Dis., 1999, 19:Supl. 1:3-15.
- 35

Ensayo de biodisponibilidad en monos cynomolgus

- 40 Una semana antes del inicio del estudio, al mono cynomolgus se le implanta quirúrgicamente un catéter venoso crónico y una compuerta de acceso venoso subcutánea (VAP, por sus siglas en inglés) para facilitar la recogida de sangre y se somete a un examen clínico que incluye evaluaciones de hematología y química del suero y se registra el peso corporal. Cada mono (seis en total) recibe cada dosis de compuesto activo en un nivel de dosis de 10 mg/kg a una concentración de la dosis de 5 mg/ml, bien a través de un bolo intravenoso (3 monos, IV) o bien a través de una sonda oral (3 monos, PO). Cada jeringa de dosificación se pesa antes de dosificar para determinar gravimétricamente la cantidad de formulación administrada. Se recogen muestras de orina a través de un plato de recogida a los intervalos indicados (aproximadamente 18-0 horas antes de la dosis, 0-4, 4-8 y 8-12 horas después de la dosificación) y se procesan. También se recogen muestras de sangre (antes de la dosis, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 horas después de la dosificación) a través del catéter venoso crónico y el VAP o desde un vaso periférico si no fuera posible el procedimiento del catéter venoso crónico. Las muestras de sangre y orina se analizan mediante LC/MS con respecto a la concentración máxima (C_{máx}), el tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (T_{máx}), el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés), la semivida de la concentración de dosificación (T_{1/2}), la depuración (CL, del inglés "clearance"), el volumen y la distribución en estado estacionario (V_{BC}) y la biodisponibilidad (F).
- 50

Ensayo de toxicidad para la médula ósea

- 55 Se recogen células de médula ósea humana de voluntarios sanos normales y la población mononuclear se separa mediante centrifugación con gradiente de Ficoll-Hypaque como se describió previamente por Sommadossi J-P, Carlisle R. "Toxicity of 3'-azido-3'-desoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro" Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1987; 31:452-454; y Sommadossi J-

P, Schinazi RF, Chu CK, Xie M-Y. "Comparison of cytotoxicity of the (-)- and (+)-enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells" *Biochemical Pharmacology* 1992; 44:1921-1925. Se realizan los ensayos en cultivo para CFU-GM y BFU-E usando un método de agar blando de doble capa o metilcelulosa. Los fármacos se diluyen en medio de cultivo tisular y se filtran. Después de 14 a 18 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire, las colonias mayores de 50 células se cuentan usando un microscopio invertido. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de formación de colonias en presencia de fármaco en comparación con cultivos de control en disolvente.

Ensayo de citotoxicidad

Las células se siembran en un grado de entre 5×10^3 y 5×10^4 /pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento durante la noche a 37°C en una atmósfera de CO₂ (5%) humidificada. Se añade a continuación nuevo medio de crecimiento que contiene diluciones en serie de los fármacos. Después de la incubación durante 4 días, los cultivos se fijan en TCA al 50% y se tiñen con sulforrodamina B. La densidad óptica se lee a 550 nm. La concentración citotóxica se expresa como la concentración requerida para reducir el número de células en 50% (CC₅₀).

Ensayo de protección celular (CPA, por sus siglas en inglés)

El ensayo se realiza esencialmente como se describe por Baginski, S. G.; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Rice, C. M. y M. S. Collett "Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound" *PNAS USA* **2000**, 97(14), 7981-7986. Células MDBK (ATCC) se siembran en placas de cultivo de 96 pocillos (4.000 células por pocillo) 24 horas antes del uso. Después de la infección con BVDV (cepa NADL, ATCC) a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,02 unidades formadoras de calvas (PFU, por sus siglas en inglés) por célula, se añaden diluciones en serie de compuestos de prueba a las células tanto infectadas como no infectadas en una concentración final de DMSO al 0,5% en medio de crecimiento. Cada dilución se prueba por cuadruplicado. Las densidades celulares y los inóculos de virus se ajustan para asegurar el crecimiento celular continuo a lo largo del experimento y para alcanzar más de 90% de destrucción celular inducida por virus en los controles no tratados después de cuatro días posteriores a la infección. Después de cuatro días, las placas se fijan con TCA al 50% y se tiñen con sulforrodamina B. La densidad óptica de los pocillos se lee en un lector de microplacas a 550 nm. Los valores de concentración eficaz al 50% (EC₅₀) se definen como la concentración del compuesto que conseguía 50% de reducción del efecto citopático del virus.

Ensayo de reducción de calvas

Para cada compuesto, la concentración eficaz se determina en placas de 24 pocillos duplicadas, mediante ensayos de reducción de calvas. Monocapas celulares se infectan con 100 PFU/pocillo de virus. A continuación, se añaden a las monocapas diluciones en serie de compuestos de prueba en MEM complementado con suero desactivado al 2% y 0,75% de metilcelulosa. Los cultivos se incuban adicionalmente a 37°C durante 3 días, a continuación se fijan con etanol al 50% y violeta cristal al 0,8%, se lavan y se secan al aire. A continuación, las calvas se cuentan para determinar la concentración para obtener 90% de supresión de virus.

Actividad biológica contra cepas de HIV resistentes a fármacos

En una realización, la eficacia de un compuesto anti-HIV se mide in vitro mediante un ensayo rápido, sensible y automatizado que implica la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Una línea celular transformada por HIV que es muy permisiva y selectiva con respecto a la infección por HIV, tal como, por ejemplo, la línea celular T-4, MT-4, se elige como la línea celular diana (Koyanagi et al., *Int. J Cancer*, **1985**, 36:445-451). La reducción in situ de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) que se ensaya espectrofotométricamente es la estándar por la que se mide la viabilidad tanto de células infectadas simuladamente como de células infectadas por HIV. La inhibición del efecto citopático inducido por HIV sirve como el punto final. Una concentración citotóxica de 50% (CC₅₀ en µM) se define como la concentración de compuesto que reduce la absorbancia de la muestra de control infectada simuladamente en 50%. El porcentaje de eficacia de un compuesto anti-HIV se calcula mediante la fórmula (expresada como un %):

$$(\text{OD}_{\text{compuesto de prueba para HIV}} - (\text{OD}_{\text{control}})) / ((\text{OD}_{\text{células infectadas simultáneamente}} - (\text{OD}_{\text{control}})))$$

En la presente, (OD_{compuesto de prueba para HIV}) es la densidad óptica medida para una cantidad específica de un compuesto de prueba en células infectadas con HIV; (OD_{control}) es la densidad óptica medida para células de control infectadas con HIV no tratadas; y (OD_{células infectadas simuladamente}) es la densidad óptica medida para células de control infectadas simuladamente que no se tratan. Los valores de la densidad óptica se evalúan típicamente a 540 nm. La dosificación de un compuesto de prueba anti-HIV que proporciona 50% de protección según la fórmula precedente se define como la concentración inhibidora de 50% (IC₅₀ en µM). El índice de selectividad (SI, por sus siglas en inglés) se define como la relación de la CC₅₀ a la IC₅₀.

En otra realización, el ensayo de ELISA de p24 se usa para determinar la eficacia de un compuesto anti-HIV. Este inmunoensayo de replicación viral mide la cantidad de antígeno de la cápsida (núcleo) viral de p24 presente, y está disponible comercialmente de fuentes tales como, por ejemplo, Coulter Corporation/Immunotech, Inc.® (Westbrook,

MI).

Otras realizaciones más incluyen un ensayo de transcriptasa inversa en el que se mide la cantidad de replicación viral utilizando un sistema cebador de plantilla de polirA:oligodT homopolímero que cuantifica la incorporación en células de monofosfato de timidina tritiado mediante métodos de recuento por centelleo (Southern Research Institute, University of Alabama, Birmingham, A I); un ensayo de inhibición sincitial que emplea células CEM-SS, HeLa-CD4 o HeLa-CD4-LTR-b-galactosidasa que tienen un punto final inmunofluorescente, quimioluminiscente o colorimétrico; y un ensayo de inhibición de la ligazón y la fusión que utiliza líneas celulares indicadoras y cuantificación mediante evaluación quimioluminiscente, colorimétrica o microscópica (Southern Research Institute, University of Alabama, Birmingham, AL).

- 5 En una realización, los compuestos indólicos de la presente invención no exhiben resistencia cruzada con otros inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos (NNRTI), ya que los compuestos de la presente invención presentan una EC_{50} (en concentración molar) en una cepa de HIV mutante de menos de aproximadamente 50, 25, 10 o 1 μM de concentración. En una realización típica, los NNRTI presentan una EC_{50} en una cepa de HIV mutante de menos de aproximadamente 5, 2,5, 1 o 0,1 μM de concentración. El grado de resistencia cruzada contra una
- 10 cepa resistente a fármaco de HIV se mide evaluando la EC_{50} del compuesto de oxopirimidina deseado en el virus mutado, es decir, resistente a fármaco, elegido como diana.

Composiciones farmacéuticas

- Los huéspedes, incluyendo seres humanos, infectados con un virus o cualquier otra afección descrita en la presente memoria, se pueden tratar administrando al paciente una cantidad eficaz del compuesto activo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables opcionalmente en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente
- 20 aceptable. Los compuestos se pueden administrar a un sujeto que lo necesite, opcionalmente en combinación o alternancia con otro agente terapéutico, y/o con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, un sujeto infectado con HIV se puede tratar administrando a ese sujeto una cantidad eficaz de un compuesto divulgado en la presente memoria o una de sus sales, en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para sujetos con resistencia a múltiples fármacos, el compuesto fosfoindólico se
- 25 administra bien solo o bien en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Los compuestos activos se pueden administrar mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo oralmente, parenteralmente, enteralmente, intravenosamente, intradérmicamente, subcutáneamente, percutáneamente, transdérmicamente, intranasalmente, tópicamente o mediante terapia de inhalación, y puede estar en forma sólida, líquida o de vapor.

- 30 El compuesto o los compuestos activos en una realización se incluyen dentro del vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para aportar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo a fin de, p. ej., inhibir una infección viral, sin provocar efectos tóxicos graves en un sujeto tratado. Una "cantidad inhibidora" incluye una cantidad de ingrediente activo suficiente para detener la replicación viral según se mide mediante, por ejemplo, un ensayo tal como los mencionados en la presente memoria.

- 35 Una dosis típica del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, de peso corporal al día, más generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del receptor al día. Se pueden usar dosificaciones inferiores, por ejemplo, dosis de aproximadamente 0,5-100 mg, 0,5-10 mg o 0,5-5 mg por kilogramo de peso corporal al día. Pueden ser útiles dosis aún menores, y así los intervalos pueden incluir de aproximadamente 0,1-0,5 mg/kg de peso
- 40 corporal del receptor al día. El intervalo de dosificación eficaz de los derivados farmacéuticamente aceptables se calcula basándose en el peso del compuesto derivado indólico original que se va a aportar. Si el propio compuesto derivado exhibe actividad, entonces la dosificación eficaz se puede estimar como anteriormente usando el peso del derivado o por otros medios conocidos por los expertos en la especialidad.

- Los compuestos se administran convenientemente en unidades de cualquier forma de dosificación adecuada, incluyendo, pero no limitada a, una que contiene de aproximadamente 7 a 3.000 mg, de aproximadamente 70 a 1.400 mg o de aproximadamente 25 a 1.000 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Por
- 45 ejemplo, habitualmente es conveniente una dosificación oral de aproximadamente 50 a 1.000 mg, incluyendo en una o múltiples formas de dosificación de 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 mg. Pueden ser preferibles dosificaciones inferiores, por ejemplo, de aproximadamente 10-100 o 1-50 mg. También se contemplan dosis de 0,1-50 mg, 0,1-20 mg o 0,1-10 mg. Por otra parte, se pueden utilizar dosis inferiores en el caso de la administración mediante una vía no oral, como, por ejemplo, mediante inyección o inhalación.
- 50

- El ingrediente activo se puede administrar de una vez o se puede dividir en un número de dosis menores que se han de administrar a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación y la duración del tratamiento precisas son una función de la enfermedad que se trate y se pueden determinar empíricamente usando protocolos de prueba
- 55 conocidos o por extrapolación de datos de prueba in vivo o in vitro. Se ha de apuntar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Se ha de entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los márgenes de concentración indicados en la presente memoria son

solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones proporcionadas en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el compuesto o la composición proporcionados en la presente memoria se pueden administrar como una sola dosis de una vez al día o preferiblemente como dosis divididas a lo largo del día. En realizaciones particulares, el compuesto o la composición se administra cuatro veces al día. En realizaciones particulares, el compuesto o la composición se administra tres veces al día. En realizaciones particulares, el compuesto o la composición se administra dos veces al día. En realizaciones particulares, el compuesto o la composición se administra una vez al día.

En una realización, el ingrediente activo se administra para alcanzar concentraciones en plasma máximas del compuesto activo de aproximadamente 0,02 a 70 μM o de aproximadamente 0,5 a 10 μM . Por ejemplo, esto se puede alcanzar mediante la inyección intravenosa de una solución al de 0,1 a 5% de ingrediente activo, opcionalmente en solución salina o administrada como un bolo de ingrediente activo. Se debe entender que para cualquier sujeto particular, se deben ajustar regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo para cumplir las necesidades individuales, y variarán dependiendo de las velocidades de absorción, desactivación y excreción del fármaco. Las concentraciones indicadas en la presente son solamente ejemplares y no están destinadas a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo se puede administrar todo de una vez o se puede dividir en un número de dosis menores que se han de administrar a intervalos de tiempo variables.

Un modo de administración del compuesto activo es el oral. Las composiciones orales incluyen habitualmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina, comprimir en forma de comprimidos o aportar en forma líquida. Para la administración terapéutica oral, al compuesto activo se le pueden incorporar excipientes o se puede formular como dispersiones sólidas o soluciones sólidas, y usarse en forma de comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas. Por una "dispersión sólida" se entiende un estado sólido que comprende al menos dos componentes, donde un componente está dispersado más o menos uniformemente en el otro componente. Por "solución sólida" se entiende un estado sólido que comprende al menos dos componentes que están integrados químicamente y físicamente para producir un producto homogéneo. Una solución sólida es típica por encima de una dispersión sólida debido a que forma más fácilmente una solución líquida al ponerla en contacto con un medio líquido apropiado, incrementando de ese modo la biodisponibilidad de un fármaco. Agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles también se pueden incluir como parte de esta composición.

Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, las pastillas para chupar y similares pueden contener cualesquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato magnésico o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante como sacarosa o sacarina; y un agente saborizante, tal como menta piperina, salicilato de metilo o saborizante de naranja. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener un vehículo líquido tal como un aceite graso además de cualquier material de los tipos dados anteriormente. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener varios otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, tales como, por ejemplo, revestimientos de azúcar, goma laca u otros agentes entéricos.

Los compuestos se pueden administrar como un componente de un elixir, una suspensión, un jarabe, un sello, una goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener sacarosa como un agente edulcorante, conservantes, tintes, colorantes y saborizantes además de los compuestos activos.

Los compuestos activos o sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden mezclar con otros materiales activos que no dificultan la acción deseada o con materiales que complementan la acción deseada, tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, inhibidores de proteasa u otros agentes antivirales nucleosídicos o no nucleosídicos. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una preparación parenteral normalmente incluirá agua estéril y se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Si se administran intravenosamente, ciertos vehículos son solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), una solución de glucosa o una solución mixta que comprende glucosa y solución salina. En una realización, el compuesto activo se prepara con un vehículo que protegerá el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo un implante y/o un sistema de aporte microencapsulado. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno/acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los materiales se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation o se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la especialidad. Si la administración es percutánea, tal como, por ejemplo, a través del uso de un

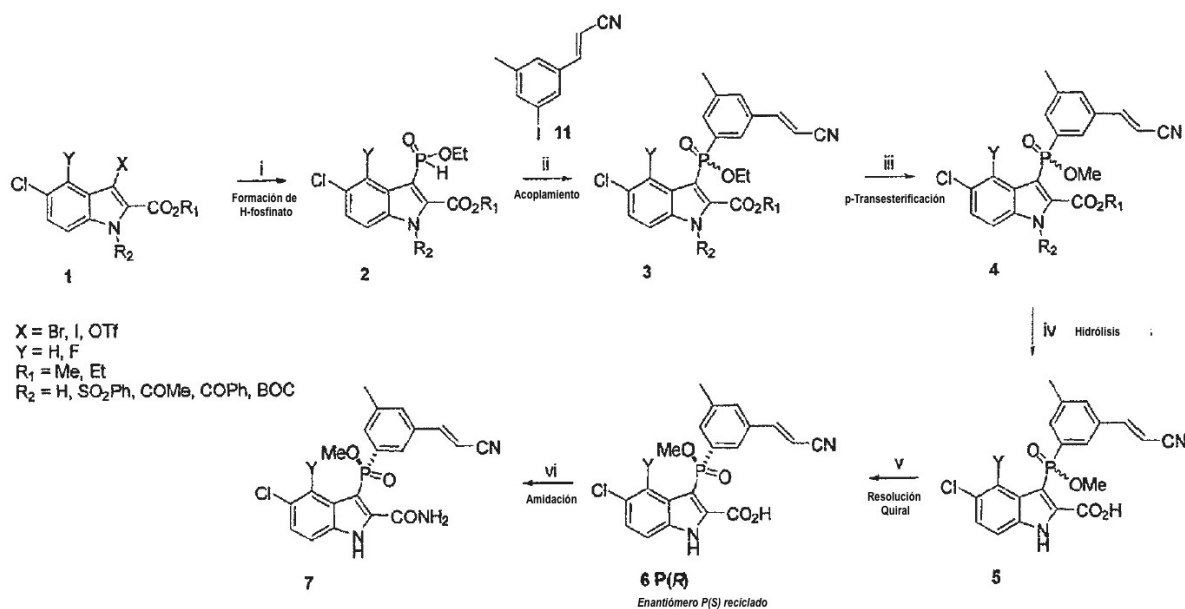
parche o una pomada, el vehículo asociado puede comprender un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado que no sean dañinos para la piel. Si la inhalación o la insuflación es la vía de administración deseada, entonces la composición de la presente invención incluye el compuesto en la forma de una solución, suspensión o polvo seco que se puede aportar a través de los orificios oral y/o nasal.

- 5 Suspensiones liposómicas, que incluyen liposomas que tienen como diana células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales, también son típicas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la especialidad, por ejemplo, como los descritos en la Patente de EE. UU. N° 4.522.811. Por ejemplo, las formulaciones liposómicas se pueden preparar disolviendo un lípido o lípidos apropiados, tales como estearoilfosfatidiletanolamina, estearoilfosfatidilcolina, arcadoilfosfatidilcolina, y colesterol, en un disolvente inorgánico que más tarde se evapora, dejando una película delgada de lípido secado sobre la superficie del recipiente. Una solución acuosa del compuesto activo o una de sus sales se introduce a continuación en el recipiente. El recipiente se somete a turbulencia para liberar material lipídico de sus costados y para dispersar agregados lipídicos, formando se ese modo la suspensión liposómica.

Procedimientos para preparar los compuestos activos

- 15 Un esquema ejemplar para la síntesis de fosfoindoles se proporciona en el Esquema 1.

Esquema general para la síntesis de fosfoindoles

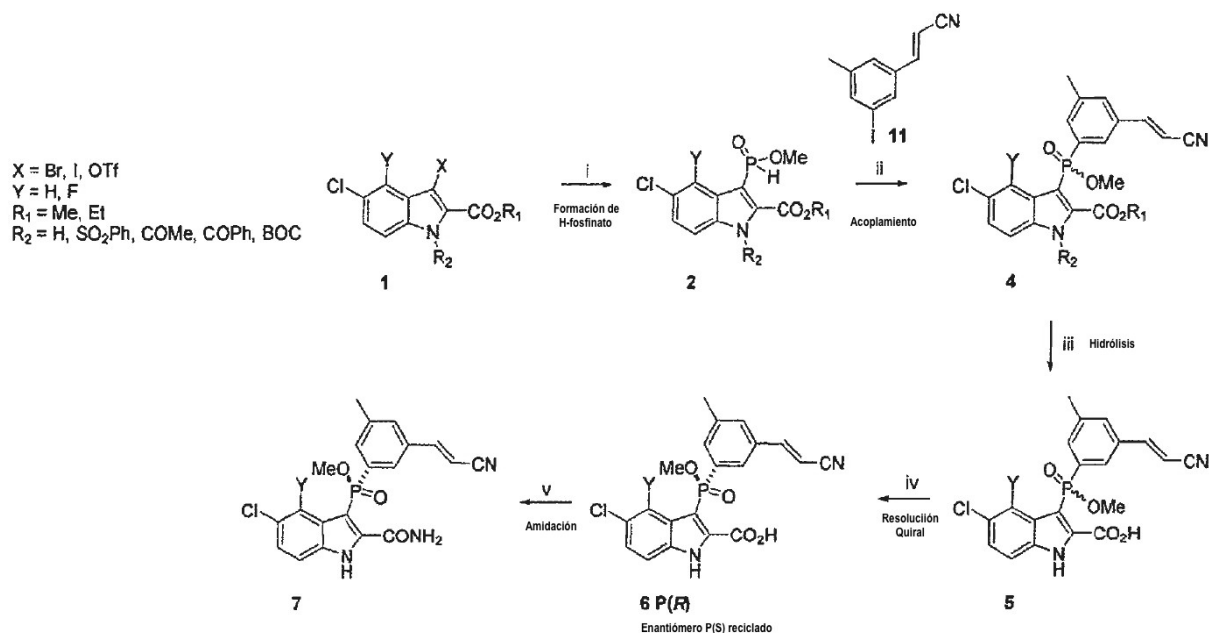


Esquema 1

- 20 La síntesis implica el tratamiento del indol protegido en N 1 con una especie litiante adecuada, por ejemplo n-butil-litio, seguido por un electrófilo de fósforo apropiado, por ejemplo clorofosfito de dietilo, para dar un producto intermedio de P(III) que se hidroliza parcialmente bajo condiciones ácidas para dar el H-fosfinato 2. La etapa ii consiste en una reacción de acoplamiento catalizada por paladio entre el H-fosfinato de indol 2 y el yodocinamonitrilo 11. La transesterificación de etilo en metilo seguida por hidrólisis de los grupos tanto éster de carboxilato como protector de N con, por ejemplo, hidróxido de litio o t-butoxido potásico, a 5°C en agua-tetrahidrofurano, da acceso al ácido indólico 5. La resolución quiral de los enantiómeros de 5, usando una base quiral, seguido por formación de amida, produce el compuesto final 7.

Un segundo esquema general ejemplar para la síntesis de fosfoindoles se proporciona en el Esquema 2.

Esquema general 2 para la síntesis de fosfoindoles

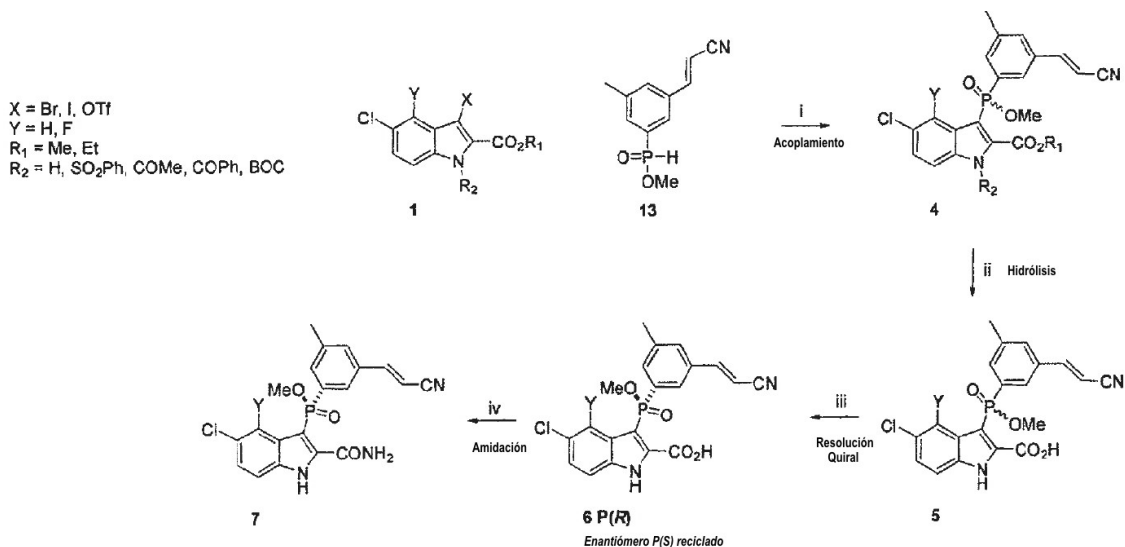


Esquema 2

Esta síntesis implica el tratamiento del indol protegido en N 1 con fosfinato de metilo bajo condiciones de catálisis con paladio suaves para dar el H-fosfinato de indol 2. La etapa ii consiste en una reacción de acoplamiento catalizada con paladio entre el H-fosfinato de indol 2 y el yodocinamonitrilo 11. La hidrólisis de los grupos tanto éster de carboxilato como protector de N con, por ejemplo, hidróxido de litio o t-butoxido potásico, a 5°C en agua-tetrahidrofurano, da acceso al ácido indólico 5. Las resolución quiral de los enantiómeros de 5, usando una base quiral, seguida por formación de amida, produce el compuesto final 7.

Una ruta alternativa ejemplar para la síntesis de fosfoindoles se muestra en el Esquema 3.

Ruta alternativa para la síntesis de fosfoindoles



Esquema 3

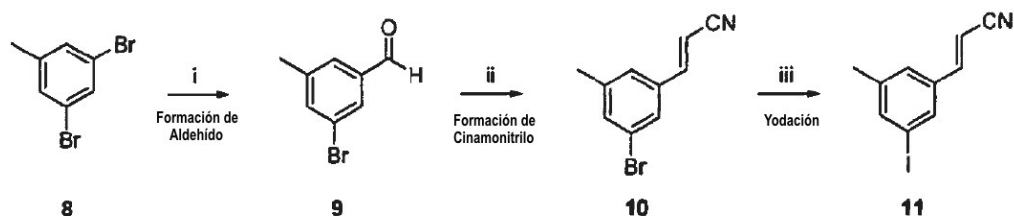
Una síntesis alternativa implica el acoplamiento del indol protegido en N 1 con H-fosfinato de arilo 13, ligando, base, en un disolvente apropiado a temperatura moderada para dar el fosfoindol 4. La formación del H-fosfinato de arilo 13 se describe en el Esquema 4. La hidrólisis de los grupos tanto éster de carboxilato como protector de N con, por

ejemplo, hidróxido de litio o t-butoxido potásico a 5°C en agua-tetrahidrofurano da acceso al ácido indólico 5. La resolución quiral de los enantiómeros de 5, usando una base quiral, seguido por formación de amida, produce el compuesto final 7.

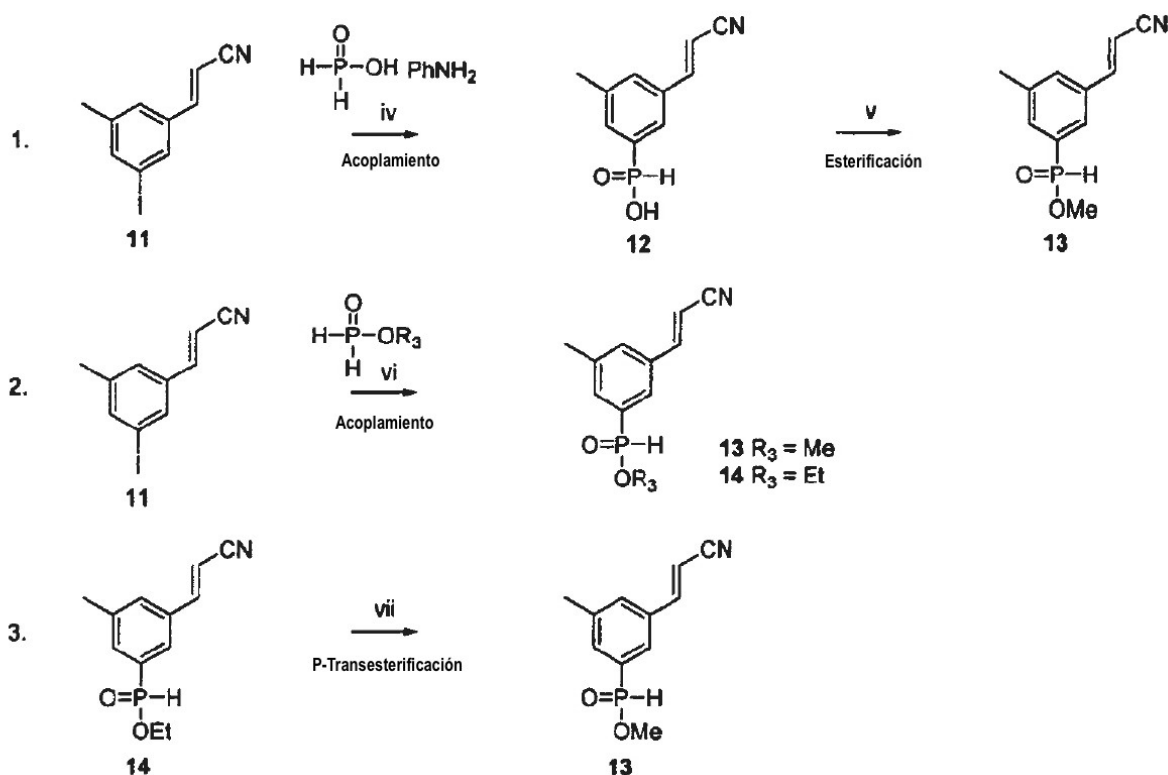
Síntesis ejemplares de yodocinamonitrilo y H-fosfato de cinamonitrilo se muestran en el Esquema 4.

5

Síntesis de yodocinamonitrilo a partir de dibromotolueno



Síntesis de H-fosfato de cinamonitrilo a partir de yodocinamonitrilo



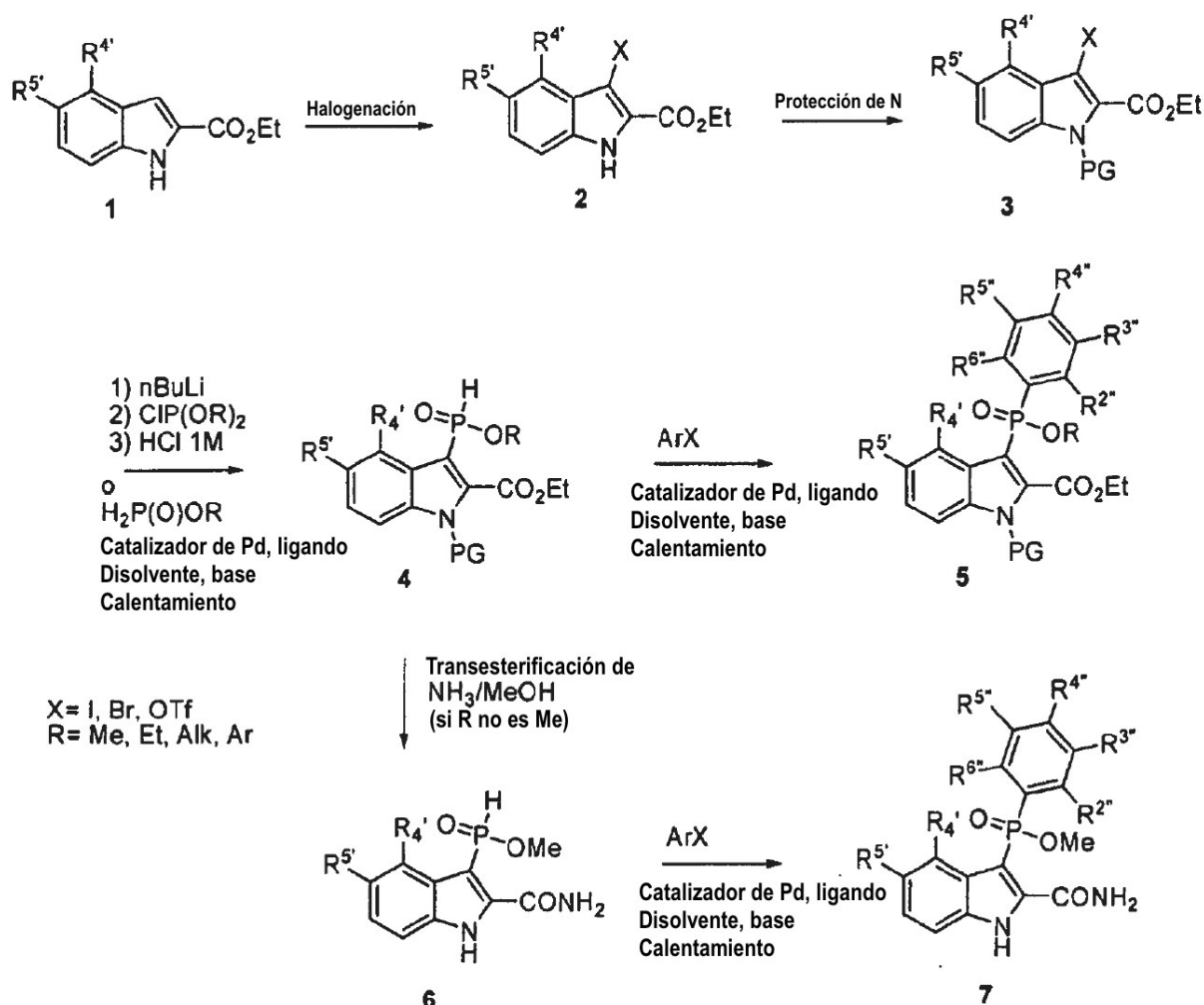
Esquema 4

- 10 El yodocinamonitrilo 11 se puede preparar a partir de dibromotolueno 8. La formación de monoaldehído de 9 se consigue mediante monolitiación, por ejemplo con n-butil-litio y cloruro de n-butilmagnesio, y el tratamiento posterior con *N,N*-dimetilformamida. Una reacción de Wittig-Homer-Emmons sobre el aldehído 9 usando, por ejemplo cianometilfosfonato de dietilo e hidruro sódico, avanza para dar principalmente el isómero *trans*, que se puede enriquecer adicionalmente mediante cristalización para dar el bromocinamonitrilo 10. A continuación se realiza yodación para proporcionar el producto intermedio 11 deseado.
- 15

Opcionalmente, el yodocinamonitrilo 11 se puede convertir en el H-fosfato de arilo 13 bien mediante; 1. acoplamiento con sal de ácido hipofosforoso de anilinio seguido por esterificación o bien mediante 2. un acoplamiento con paladio directo con un fosfinato de alquilo. Adicionalmente, el aril-H-fosfinato de etilo 14 se puede transesterificar para dar el H-fosfato de metilo 13.

- 20 Los 3-fosfoindoles se pueden preparar según técnicas conocidas por los expertos en la especialidad, incluyendo técnicas descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2006/0074054, cuyo contenido se incorpora por la presente memoria mediante referencia en su totalidad.

Otra síntesis general para preparar el fosfinato de indol se proporciona mediante el esquema posterior. La síntesis empieza a partir del indol 1, que está halogenado en 3 y protegido en N (o protegido en N y halogenado en 3) para dar el indol protegido 3. Los grupos protectores ("PG") pueden ser fenilsulfonilo, carbamato de terc-butilo (Boc), carbamato de bencilo (Cbz), benzoílo, bencilo, parametoxibencilo u otra protección de bencilo no sustituido, terc-butildimetilsililo, terc-butildifenilsililo o cualquier protección de indol N-1. El último 3 bien está implicado en un intercambio halógeno-metal, por ejemplo con n-butil-litio, y a continuación reacciona con un clorofosfito de dietilo para producir, después de la hidrólisis ácida, el H-fosfinato 4, o bien está implicado en una reacción catalizada por paladio con éster hipofosforoso para producir el mismo producto 4. En H-fosfinato de indol 4 está implicado a continuación en otra reacción catalizada por paladio con un haluro de arilo para dar el 3-fosfinato de indol 5. En el caso de R diferente de un grupo metilo, una transesterificación de 4 en amoníaco en metanol daba la H-fosfinatoindolcarboxamida 6. Este compuesto también está implicado en una reacción catalizada por paladio con un haluro de arilo para producir el compuesto final 7.

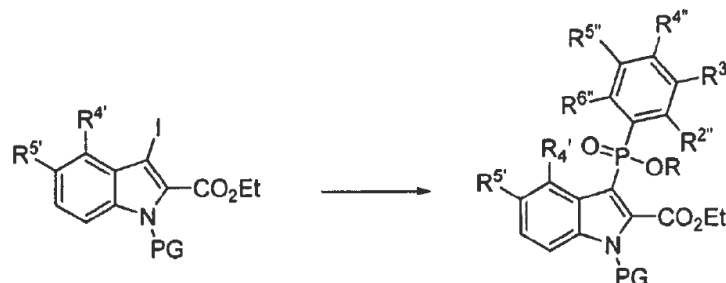


Esquema 5

Catalizadores de paladio adecuados para la reacción de acoplamiento cruzado incluyen, por ejemplo: tetraquis(trifenilfosfina)paladio, acetato de paladio, propionato de paladio, diacetonitrilodichloruro de paladio, dipaladio-tris(dibencilidenacetona) (Pd_2dba_3), palladio-carbeno N-heterocíclico (NHC) o cualquier otro catalizador de paladio que sea conocido para los expertos en la especialidad, usado solo o en asociación con ligandos tales como trifenilfosfina, difenilfosfinoferroceno, difenilfosfinopropano o cualesquiera ligandos de fosfina o difosfina que sean conocidos por los expertos en la especialidad. Disolventes adecuados para la reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio incluyen, por ejemplo: DMF, acetonitrilo, NMP, dioxano, metanol, THF, tolueno. Bases adecuadas para la reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio incluyen, por ejemplo: Et_3N , diisopropilamina, K_2CO_3 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Cs_2CO_3 , N-metilmorfolina, DABCO, DBU.

En realizaciones adicionales, los 3-fosfoindoles se pueden preparar haciendo reaccionar un H-arilfosfinato con un 3-yodoindol según se representa en el esquema posterior. El 3-yodoindol se puede preparar mediante la yodación de un indol usando reactivos de yodación conocidos por los expertos en la especialidad. Opcionalmente, el átomo de

nitrógeno del 3-yodoindol se puede proteger con cualquier grupo protector considerado adecuado por los expertos en la especialidad. La reacción con un H-arilfosfinato proporciona el compuesto de 3-fosfoindol. En el esquema, PG indica el grupo protector. El grupo protector se puede retirar según cualquier técnica conocida por los expertos en la especialidad.



Esquema 6

Preparación de 3-fosfoindoles enantiómeramente puros

La preparación de 3-fosfoindoles sustancialmente en la forma de un enantiómero se puede conseguir mediante la resolución de mezclas racémicas de 3-fosfoindoles preparadas mediante cualquier método adecuado o mediante síntesis quiral a partir de materias primas, reactivos o catalizadores quirales. Los compuestos se pueden preparar mediante una de las técnicas descritas en la presente memoria o mediante una combinación de las técnicas, cuando sea necesario. Por ejemplo, la síntesis quiral se puede combinar con resolución química para preparar un enantiómero de un 3-fosfoindol con la pureza química y estereoisómera deseada. Además, los estereoisómeros de 3-fosfoindoles se pueden separar mediante cromatografía usando una fase sólida quiral. También se prevé la separación cromatográfica de derivados diastereoisómeros de estereoisómeros de 3-fosfoindoles.

Para resolver una mezcla de compuestos quirales, se puede emplear cualquier método considerado adecuado por los expertos en la especialidad, p. ej., formación de sales diastereoisómeras iónicas (o complejos de coordinación) con compuestos quirales y separación mediante cristalización fraccionada u otros métodos, formación de compuestos diastereoisómeros con reactivos de derivación quirales, separación de los diastereoisómeros y conversión en los enantiómeros puros, separación de los enantiómeros directamente bajo condiciones quirales sobre una variedad de matrices incluyendo cromatografía supercrítica e hidrólisis enzimática. Véase, p. ej., Eliel & Wilen, 1994, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994); Lochmuller, 1975, *J. Chromatogr.*, 113:(3) 283-302.

Por ejemplo, se pueden formar sales diastereoisómeras mediante la reacción de bases quirales enantiómeramente puras tales como, por ejemplo, cinconidina, brucina, quinina, efedrina, estricnina, α -metil- β -feniletilamina (anfetamina) y similares con compuestos proporcionados en la presente memoria. En ciertas realizaciones, se forma una sal diastereoisómera mediante la reacción con un alcaloide tal como cinconidina. Las sales diastereoisómeras pueden ser inducidas a separarse, por ejemplo, mediante cristalización fraccionada o cromatografía iónica. Alternativamente, una mezcla de compuestos quirales que se va a resolver se puede hacer reaccionar con un enantiómero de un compuesto quiral para formar un par diastereoisómero. Por ejemplo, se pueden formar compuestos diastereoisómeros haciendo reaccionar los compuestos de la invención con reactivos de derivación quirales enantiómeramente puros, tales como, por ejemplo, derivados de mentilo, seguido por separación de los diastereoisómeros e hidrólisis para dar compuesto enantiómeramente enriquecido libre. Alternativamente, una mezcla de compuestos quirales se puede separar mediante cromatografía usando una fase estacionaria quiral, véanse, p. ej., *Chiral Liquid Chromatography*, W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, Nueva York, (1989); Okamoto, 1990, *J. Chromatogr.* 513:375-378.

Se describen en la presente memoria métodos para producir un compuesto de la invención mediante la reacción de una mezcla racémica con un reactivo quiral seguido por la recuperación del producto resultante y la conversión en el compuesto de la invención. Se describen métodos para preparar un compuesto de cualquiera de las Fórmulas A-D que comprenden las etapas de hacer reaccionar una forma racémica del compuesto con un reactivo quiral tal como cinconidina, recuperación del producto de reacción y conversión en el compuesto de cualquiera de las Fórmulas A-D. Se describen métodos para producir el compuesto I que comprenden la etapa de poner en contacto la forma racémica del derivado 2-carboxílico del compuesto I con cinconidina (-), la recuperación del producto de reacción y la conversión en el compuesto I con, p. ej., ácido seguido por formación de amida. Se describen métodos para producir el compuesto II que comprenden la etapa de poner en contacto la forma racémica del derivado 2-carboxílico del compuesto II con cinconina (+), recuperación del producto de reacción y conversión en el compuesto II con, p. ej., ácido seguido por formación de amida. Se describen métodos para producir el compuesto III que comprenden la etapa de poner en contacto la forma racémica del derivado 2-carboxílico del compuesto III con cinconidina (-), recuperación del producto de reacción y conversión en el compuesto III con, p. ej., ácido seguido por formación de amida. Se describen métodos para producir el compuesto IV que comprenden la etapa de poner en contacto la

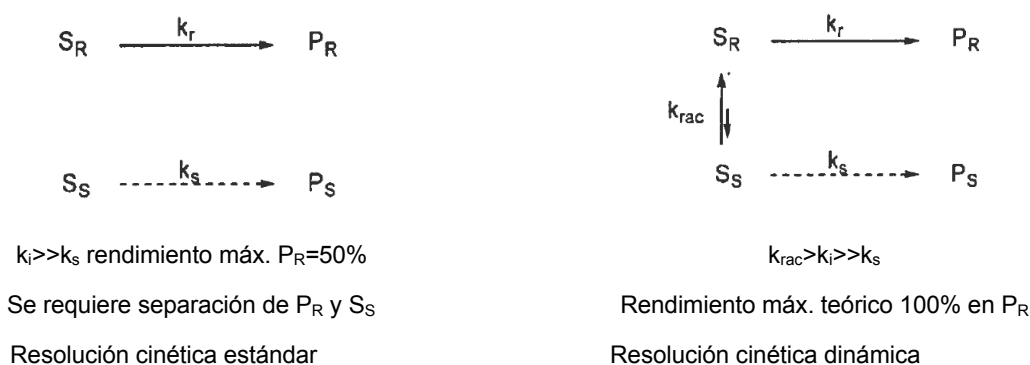
forma racémica del derivado 2-carboxílico del compuesto IV con (+)-cinconina, recuperación del producto de reacción y conversión en el compuesto IV con, p. ej., ácido seguido por formación de amida. Se describen métodos alternativos con otros reactivos quirales tales como efedrina y hemihidrato de efedrina.

Se describen métodos para producir un compuesto proporcionado en la presente memoria reciclando su enantiómero opuesto. En estos, una mezcla racémica se resuelve según una técnica descrita en la presente memoria. Además, para obtener el enantiómero deseado, el enantiómero opuesto se puede reciclar para incrementar el rendimiento del enantiómero deseado. Por poner un ejemplo, un compuesto de Fórmula B se puede reciclar para dar un compuesto de fórmula A, y viceversa. Un compuesto de fórmula D se puede reciclar para dar un compuesto de Fórmula C, y viceversa. En una reacción de reciclado, un compuesto se pone en contacto con un reactivo capaz de racemizar el compuesto. Por poner un ejemplo, un compuesto fosfoindólico proporcionado en la presente memoria se pone en contacto con un reactivo de racemización capaz de reaccionar con su grupo fosfo. El reactivo de racemización es, por ejemplo, un ácido, una base o un reactivo de halogenación. El reactivo de racemización es, por ejemplo, cloruro de oxalilo. Después de poner en contacto con el reactivo de racemización, los enantiómeros se pueden resolver según cualquier técnica descrita en la presente memoria. Por ejemplo, el compuesto II se puede reciclar para dar el compuesto I. Por ejemplo, el compuesto IV se puede reciclar para dar el compuesto III. Métodos ejemplares se proporcionan posteriormente.

Los métodos posteriores describen la síntesis de 3-fosfoindoles enantiómeramente puros de Fórmulas A-D o los Compuestos I-IV como ejemplos no limitativos de estas técnicas.

1. Resolución cinética dinámica (DKR, por sus siglas en inglés)

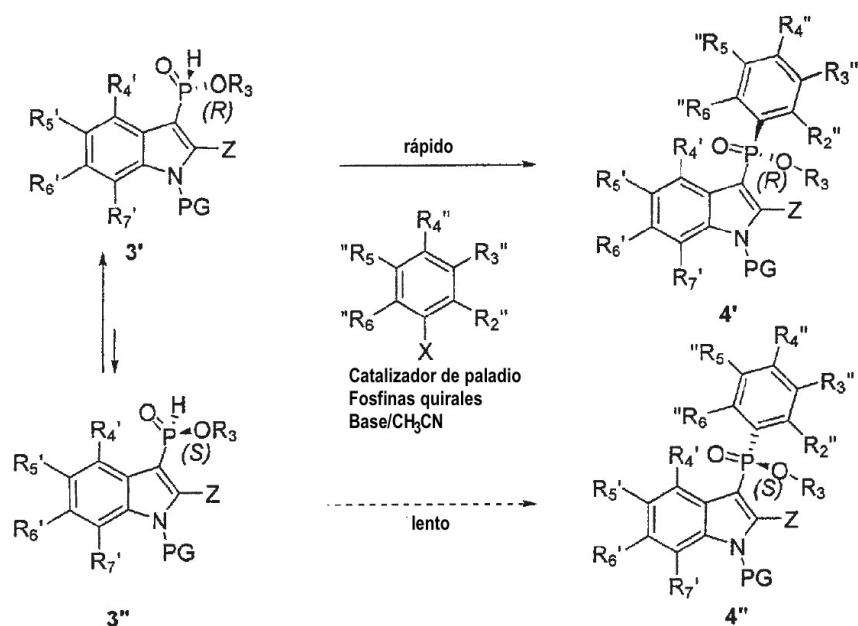
En una resolución cinética, partiendo de una mezcla racémica S (S_R y S_S), un enantiómero reaccionará preferentemente para dar el producto P_R con un rendimiento máximo teórico de 50%. Si la racemización se puede producir simultáneamente con la resolución cinética, entonces teóricamente 100% de la mezcla racémica se puede convertir en un enantiómero (Esquema 7). Este procedimiento se conoce como resolución cinética dinámica (DKR).



Esquema 7: (S= sustrato, P= producto)

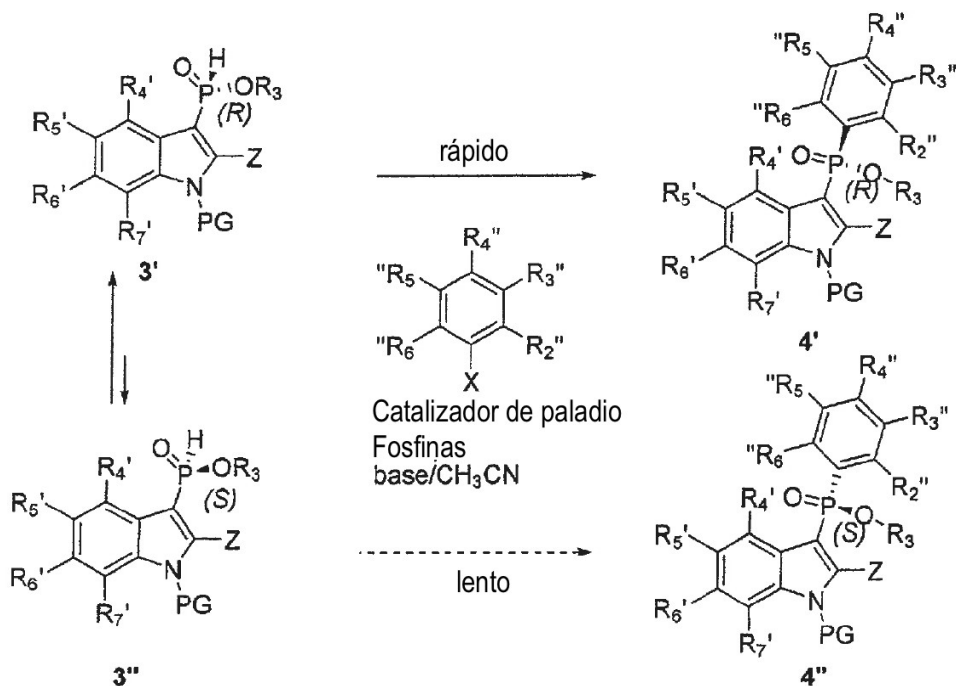
Los problemas asociados con la resolución cinética estándar son que solo es posible un rendimiento teórico máximo de 50%, y es necesaria la separación del producto deseado de una cantidad sustancial del sustrato no cubierto. Para una DKR eficaz, hay algunos requisitos específicos (Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* 1999,10,107):

1. La resolución cinética debe ser irreversible a fin de asegurar una alta enantioselectividad.
2. La relación enantiómera ($E = k_R/k_S$) debe ser al menos mayor de ~20.
3. Para evitar el agotamiento de S_R , la velocidad de racemización (k_{rac}) debe ser al menos igual a o mayor que la velocidad de reacción del enantiómero rápido (k_R).
4. En caso de que las selectividades sean solo moderadas, k_{rac} debe ser mayor que k_R en un factor de ~10.
5. Debe estar ausente cualquier reacción espontánea que implique los enantiómeros del sustrato así como la racemización del producto.



Esquema 8

Por ejemplo, la síntesis de 3-fosfoindoles enantiómericamente puros, la discriminación quiral entre los enantiómeros a fin de que reaccionen con el haluro de arilo, se efectúa con una fosfina quiral, que es un componente del catalizador de paladio, y producirá preferentemente el compuesto 4' (Esquema 8). Esta reacción de acoplamiento con paladio es una variación de las reacciones de acoplamiento con paladio descritas en los esquemas anteriores para la preparación de mezclas racémicas de 3-fosfoindoles. Los ligandos de fosfina quirales pueden ser cualquier ligando adecuado que produzca la selectividad y la velocidad de reacción requeridas en la transformación del 3-fosfoindol 3' en el 3-fosfoindol sustituido 4'. Los ligandos de fosfina quirales pueden ser ligandos monodentados o bidentados. Ejemplos no limitativos de ligandos de fosfina quirales incluyen ferrocenilfosfinas P-quirales, (R)-(+)-BINAP, (S)-(-)-BINAP, (R,R)-CHIRAPHOS y (S,S)-CHIRAPHOS.

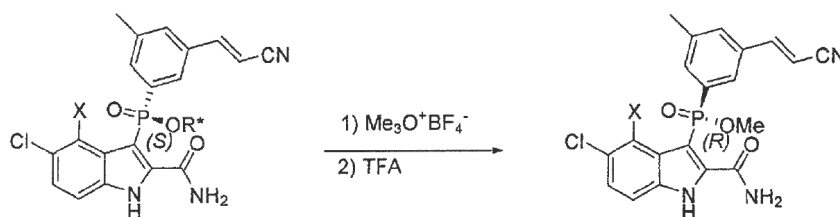


Donde la quiralidad es introducida por los grupos quirales: R₃, Z o PG

Esquema 9

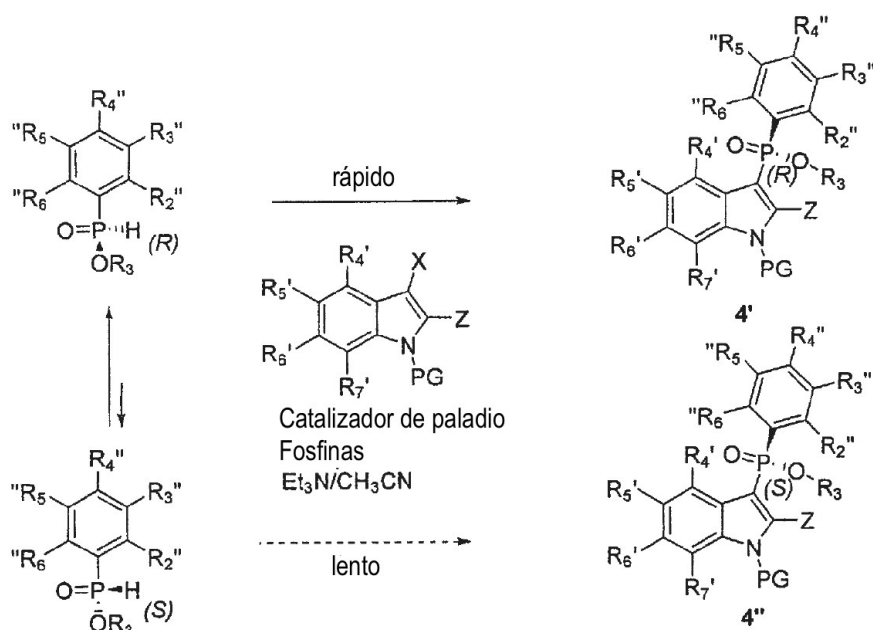
Por ejemplo, la discriminación quiral se puede introducir anexando un grupo quiral a la mezcla racémica de 3-fosfoindoles, produciendo una mezcla de diastereoisómeros que reaccionarán a diferentes velocidades con el sistema catalítico de paladio no quiral (Esquema 9). El segundo centro quiral se puede añadir como un componente del sustituyente R_3 , el grupo Z o el grupo protector PO. El grupo quiral no está limitado, y se puede usar cualquier grupo que induzca la selectividad deseada en la reacción a una velocidad razonable. Un ejemplo no limitativo de un grupo quiral que se puede utilizar como R_3 en esta reacción incluye un alcohol quiral, por ejemplo (+) o (-)-mentol. Otros ejemplos no limitativos de grupos que se pueden usar como grupo Z o PG en el Esquema 9 incluyen un éster quiral o una sulfona quiral.

Cuando R_3 es quiral (R^*), para la transformación en el 3-fosfoindol elegido, el resto quiral R^* se puede retirar usando las condiciones descritas en JOC 1975, 1523-1525 usando una sal de trialquioxonio seguido por escisión ácida, con inversión de la configuración (Esquema 10):



Esquema 10

Se puede utilizar el mismo procedimiento de DKR con un H-fosfinato de arilo racémico y un bromoindol en una reacción de acoplamiento cruzado (Esquema 11):

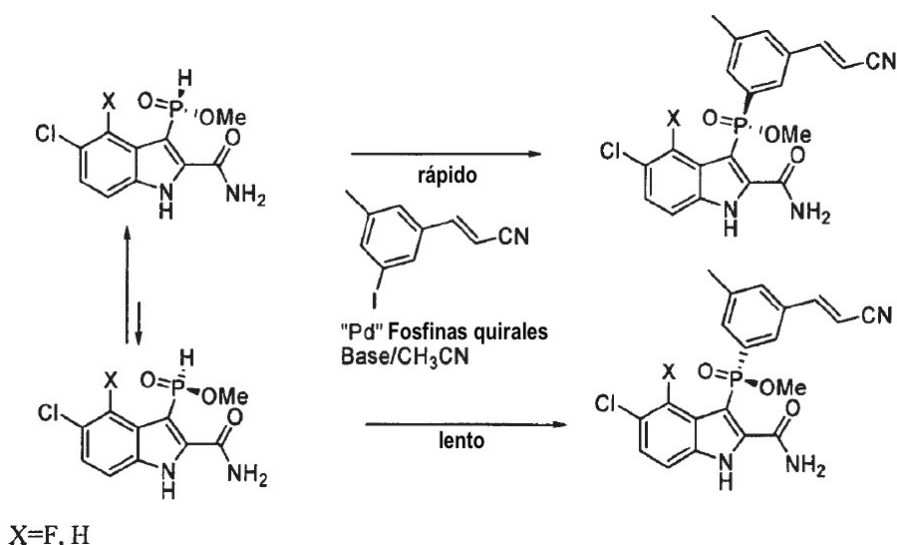


Donde la quiralidad se induce mediante grupos quirales: R_3 , Z, PG o usando fosfinas quirales.

Esquema 11

Esquema de DKR específico

En el siguiente ejemplo no limitativo de un procedimiento de DKR representado en el Esquema 12, el catalizador de Pd es acetato de paladio, la fosfina quiral es (R)-1-[(S)-2-di-2-furilfosfino]-ferrocenil]etilidi-(2-metilfenil)fosfina, la base es diisopropiletilamina y el disolvente es acetonitrilo. Después de calentar a 100°C, se obtiene el compuesto principal con un exceso enantiómero de 40%.

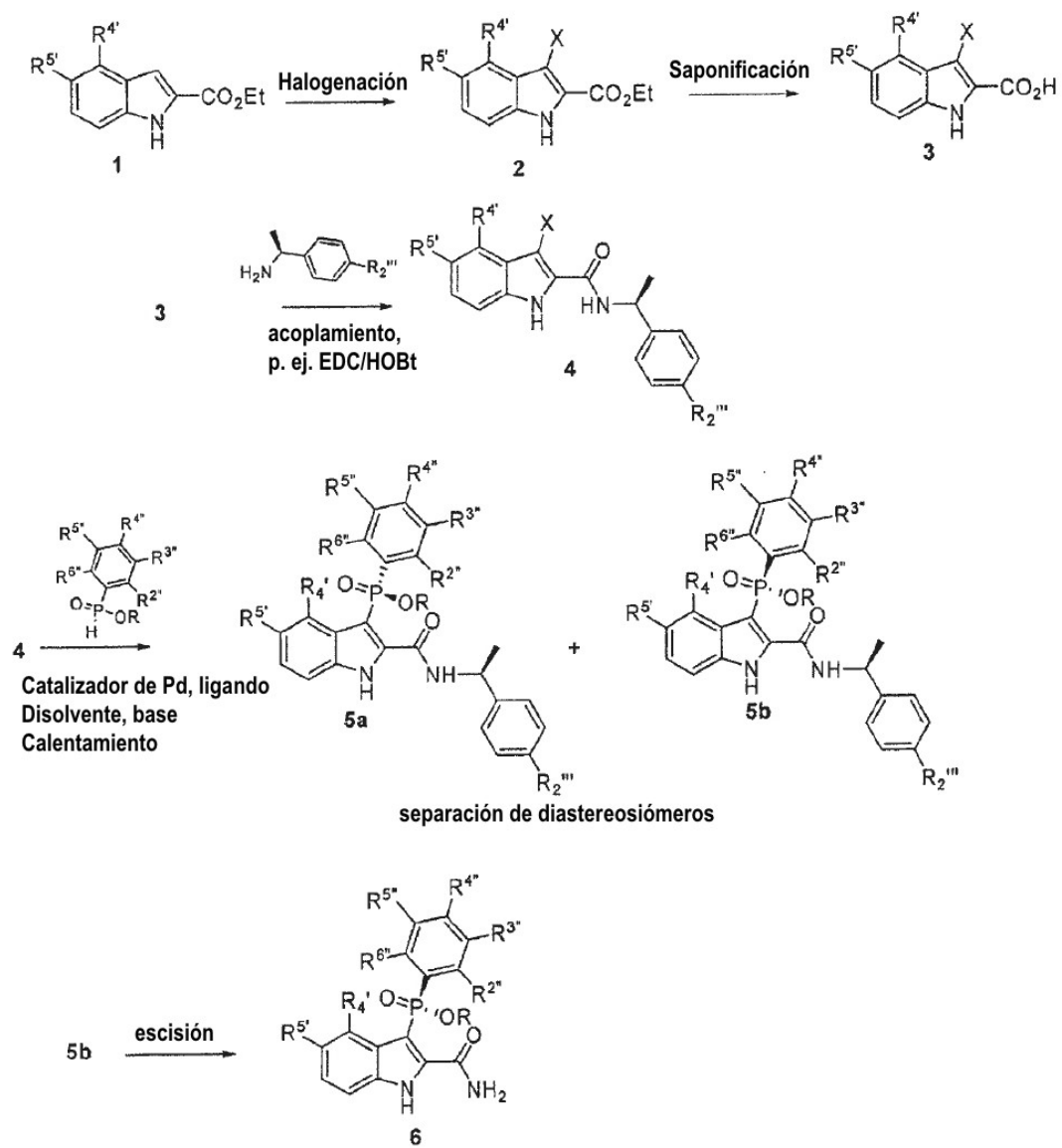


Esquema 12

2. Resolución química de 3-fosfoindoles

La resolución de los ácidos libres de 3-fosfoindoles se puede efectuar mediante resolución química usando una base quiral. Una base quiral exhibirá selectividad hacia el ácido libre de uno de los dos enantiómeros de los 3-fosfoindoles, proporcionando de ese modo los medios para resolver los enantiómeros. Según se describe en el Ejemplo posterior, la resolución química del derivado 2-carboxílico de los 3-fosfoindoles de Fórmula I/II se puede realizar sobre **1** usando cinconidina (-) **2** (Esquema 13, para obtener el enantiómero requerido, eluyendo en primer lugar mediante análisis de HPLC quiral) y cinconina (+) **3** (que se puede usar para retirar el enantiómero no deseado del filtrado, eluyendo en segundo lugar el isómero mediante análisis de HPLC quiral). El enantiómero no deseado se puede racemizar para obtener más material.

También se podría aplicar una estrategia que usa bencilamina sustituida con metilo en α quiral según se representa en el esquema posterior. El indol **1** se halogena en la posición 3 y a continuación la función éster se hidroliza para dar el indol **3**. Una bencilamina sustituida con metilo en α (o no sustituida) quiral (donde la quiralidad se define S o R) se introduce a continuación en la función carboxílica del indol **3** a través de una reacción de acoplamiento de "tipo peptídico". Alternativamente, se podría preparar **4** a través de la formación de cloruro de ácido mediante el tratamiento del ácido **3** con un reactivo clorado y a continuación la adición de la bencilamina sustituida con metilo en α (o no sustituida) quiral. El producto intermedio **4** está implicado entonces en una reacción catalizada por paladio para producir una mezcla de diastereoisómeros **5a** y **5b**. La mezcla de **5a** y **5b** se podría separar bien mediante gel de sílice o bien mediante recristalización. **5b** (quiralidad R sobre el fósforo) está implicado entonces en una relación de escisión para retirar el resto quiral en la posición 2 y suministrar enantiómero (R) **6** puro. **5a** se podría reciclar mediante transformación en un ácido fosfínico mediante escisión (p. ej. con TMSBr) y a continuación reesterificarse para producir una mezcla de **5a** y **5b**, y a continuación los diastereoisómeros se podrían volver a separar.



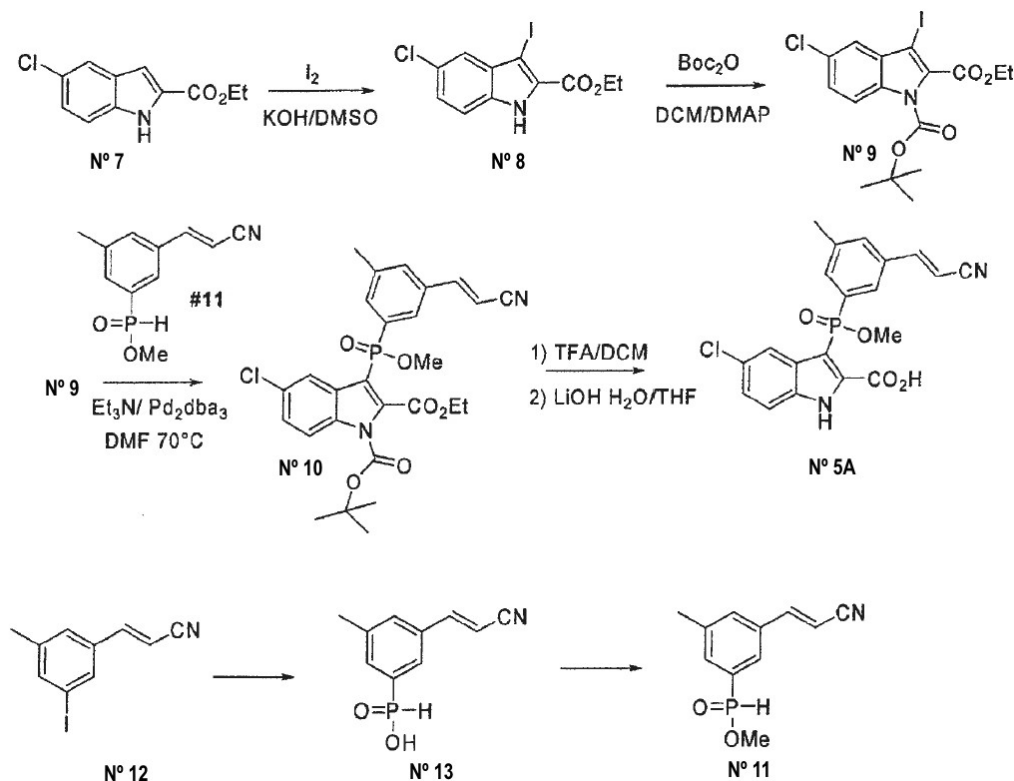
Esquema 13

Ejemplos

Ejemplo 1

El presente ejemplo describe la preparación del compuesto III (invención) y el compuesto I (referencia).

Compuesto III



5

Reacción 7 a 8:

Se añadió a un matraz bajo argón el indol 7 (1 eq.), se añadió yodo (1,98 eq.), hidróxido potásico sólido (1 eq.) y DMF anhidra (4,5 ml/mmol). La mezcla de reacción se agitó 3 horas y a continuación se añadió agua y la suspensión se filtró a través de papel de filtro, el sólido se secó bajo presión reducida y se trituró/filtró en agua varias veces para dar después del secado bajo presión reducida el 3-yodoindol 8. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,45 (t, 3H), 4,50 (q, 2H), 7,20-7,40 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 9,40 (s an, 1H).

10

Reacción 8 a 9:

Se añadieron dicarbonato de di-terc-butilo (1,8 eq.) y 4-dimetilaminopiridina (2 eq.) a una solución agitada del indol 8 (1 eq.) en diclorometano (3,5 ml/mmol) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó 18 horas y a continuación se añadió tampón de fosfato (pH=7) y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/ $EtOAc$: 1/1) para producir el indol protegido por Boc en N 9. Sólido amarillo claro. 1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,34 (t, $J = 8,0$ Hz, 3H), 1,56 (s, 9H), 4,35 (q, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,46 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,55 (dd, $J = 12,0$ y $4,0$ Hz, 1H), 8,0 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), MS (ES^-) $m/z = 448$ (M-H).

15

Reacción 9 a 10:

Una solución agitada de DMF desgasificada con N_2 , el N-Boc-3-yodoindol 9 (1 eq.), el H-arilfosfinato 11 (1,1 eq.), trietilamina (2 eq.) y Pd_2dba_3 (0,2 eq.) se calentó a $70^\circ C$ o $90^\circ C$ hasta que la reacción se acaba según el análisis por TLC o HPLC. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura normal y el disolvente se evaporó. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/ $EtOAc$: 8/2) para producir el fosfinato de indol 10 (también con algo de indol desprotegido). Sólido blanco. 1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,58 (s, 9H), 2,35 (s, 3H), 3,70 (d, $J = 11,5$ Hz, 3H), 4,29 (m, 2H), 6,53 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 7,53 (dd, $J = 9,0$ y $2,2$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,84 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 8,06 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), MS (ES^+) $m/z = 543$ (MH+).

25

Reacción 12 a 13:

El yodoarilo 12 (1 eq), dimetilformamida (1 ml/mmol), trietilamina (3 eq) y la sal hipofosforosa de anilino* (1,25 eq) se pusieron en un tubo de presión y se desgasicaron con N₂ durante 15 min. A continuación, se añadió tetraquispaladio y esta mezcla se agitó a 85°C durante la noche.

- 5 El disolvente se evaporó y se añadió agua (pH = 5-6). La mezcla se basificó con NaHCO₃ hasta pH = 8 y se extrajo con éter dietílico. La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH = 1 y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar el compuesto n° 13.

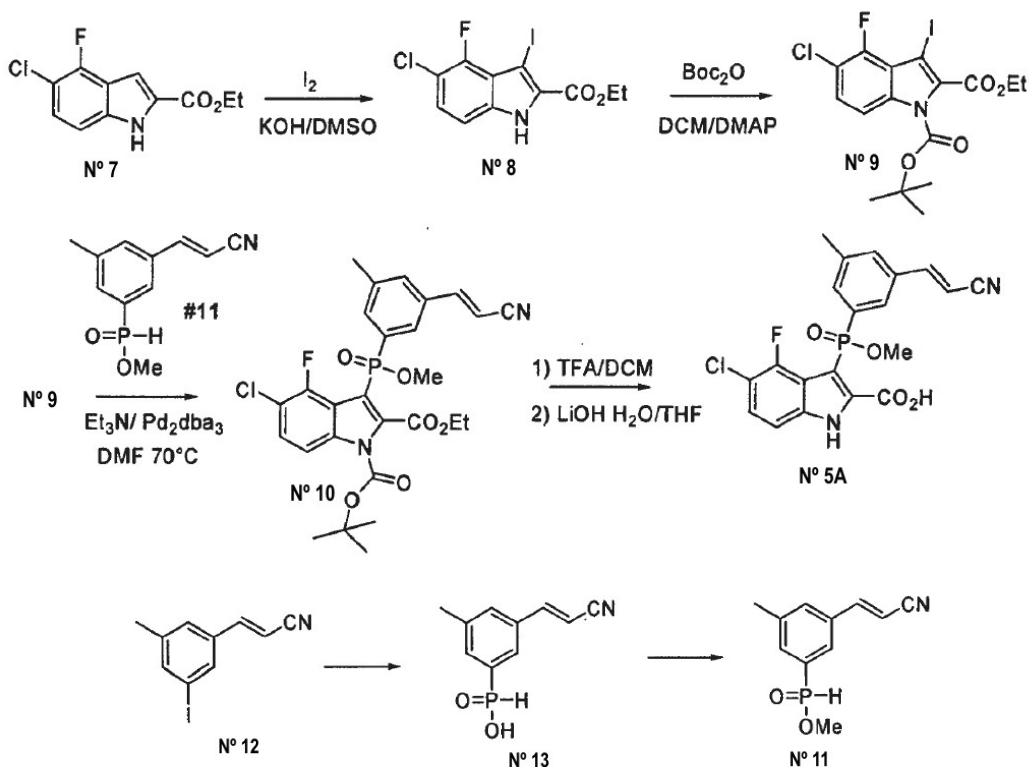
Se sintetizó la sal de anilino según el procedimiento de Montchamp et al (*J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123,510-511).

- 10 Sólido blancuzco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 6,54 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 549,8 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 7,71 (m, 3H), ³¹P NMR (*d*₆-DMSO, 121,49 MHz) δ 5,56, MS (ES⁺) *m/z* = 208.

Reacción 13 a 11

- 15 Se añadió cuidadosamente piridina (1 eq) a una solución vigorosamente agitada de cloroformiato de alquilo (1 eq) y ácido arilfosfónico 12 (1 eq) en diclorometano (2 ml/mmol) a temperatura normal. Una vez que se hubo detenido la efervescencia, la solución se sometió a reflujo durante 15 minutos y a continuación se dejó enfriar hasta temperatura normal. La solución se vertió en ácido clorhídrico 0,1 M (1 ml/mmol) y la capa orgánica se separó. Después de lavar con agua y secar sobre Na₂SO₄, el disolvente se retiró a vacío para dar el compuesto n° 11. Sólido blanco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 2,40 (s, 3H), 3,71 (d, *J* = 12,2 Hz, 3H), 6,58 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 576,0 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 14,0 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,80 (m, 2H), MS (ES⁺) *m/z* = 222.

Compuesto I



Reacción 7 a 8:

- 25 Se añadieron yodo (1,98 eq.) e hidróxido potásico (1,0 eq.) a una solución agitada del indol 7 (1,0 eq.) en dimetilformamida (4,4 ml/mmol) bajo argón. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se extinguió mediante la adición de agua (8,8 ml/mmol) y se precipitó el producto, que se filtró y se secó. El sólido se sometió de nuevo a las condiciones de reacción (dimetilformamida (4,4 ml/mmol) bajo argón, yodo (0,4 eq.) e hidróxido potásico (0,2 eq.) y se agitó durante 1 h) para convertir la materia prima restante. La mezcla de reacción se extinguió mediante la adición de agua (8,8 ml/mmol) y se precipitó el producto, que se filtró y se secó para producir el 3-yodoindol 8. Sólido beige. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,39 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 4,40 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,35-7,42 (m, 2H), 12,66 (s, 1H), ¹⁹F NMR (*d*₆-DMSO, 376 MHz) δ -126,87, MS (ESI⁻) *m/z* = 366,13 (M-H)⁻ 100%, 368,15 (M-H)⁻ 35%.
- 30

Reacción 8 a 9:

Se añadieron dicarbonato de di-terc-butilo (1,8 eq.) y 4-dimetilaminopiridina (2 eq.) a una solución agitada del indol 8 (1 eq) en diclorometano (3,5 ml/mmol) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó 18 horas y a continuación se añadió tampón de fosfato (pH=7) y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 1/1) para producir el indol protegido con Boc en N 9. Sólido blanco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,57 (s, 9H), 4,39 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,64 (dd, *J* = 7,3 y 9,1 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), ¹⁹F NMR (*d*₆-DMSO, 377 MHz) δ -126,9, MS (ESI, EI⁺) *m/z* = 490 (M+Na⁺).

10 Reacción 9 a 10:

Una solución agitada de DMF desgasificada con N₂, el N-Boc-3-yodoindol 9 (1 eq.), el H-arilfosfinato 11 (1,1 eq.), trietilamina (2 eq.) y Pd₂dba₃ (0,2 eq.) se calentó a 70°C o 90°C hasta que la reacción se acababa según el análisis por TLC o HPLC. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura normal y el disolvente se evaporó. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 8/2) para producir el fosfinato de indol 10 (también con algo de indol desprotegido). Sólido blanco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,34 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,62 (s, 9H), 2,35 (s, 3H), 3,66 (d, *J* = 11,6 Hz, 3H), 4,37 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 6,51 (d, *J* = 16,7 Hz, 1H), 7,58-7,65 (m, 2H), 7,69-7,77 (m, 3H), 7,94 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), ¹⁹F NMR (*d*₆-DMSO, 377 MHz) δ -116,0 (s, 1F), ³¹P NMR (*d*₆-DMSO, 162 MHz) δ 23,42 (s, 1P), MS (ESI, EI⁺) *m/z* = 561 (M+H).

Reacción 12 a 13:

20 El yodoarilo 12 (1 eq.), dimetilformamida (1 ml/mmol), trietilamina (3 eq) y la sal hipofosforosa de anilinio* (1,25 eq) se pusieron en un tubo de presión y se desgasificaron con N₂ durante 15 min. A continuación, se añadió tetraquispaladio y esta mezcla se agitó a 85°C durante la noche.

25 El disolvente se evaporó y se añadió agua (pH = 5-6). La mezcla se basificó con NaHCO₃ hasta pH = 8 y se extrajo con éter dietílico. La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH = 1 y se extrajo con acetato de etilo. Las capas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar el compuesto n° 13.

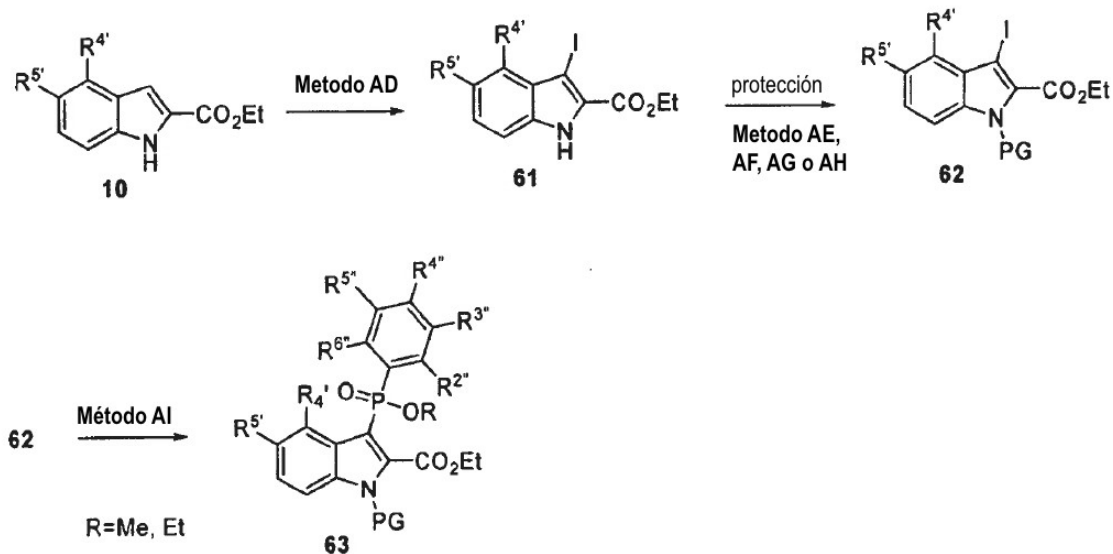
La sal de anilinio se sintetizó según el procedimiento de Montchamp et al (*J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 510-511).

Sólido blancuzco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 6,54 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 549,8 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 7,71 (m, 3H), ³¹P NMR (*d*₆-DMSO, 121,49 MHz) δ 15,56, MS (ES⁻) *m/z* = 208.

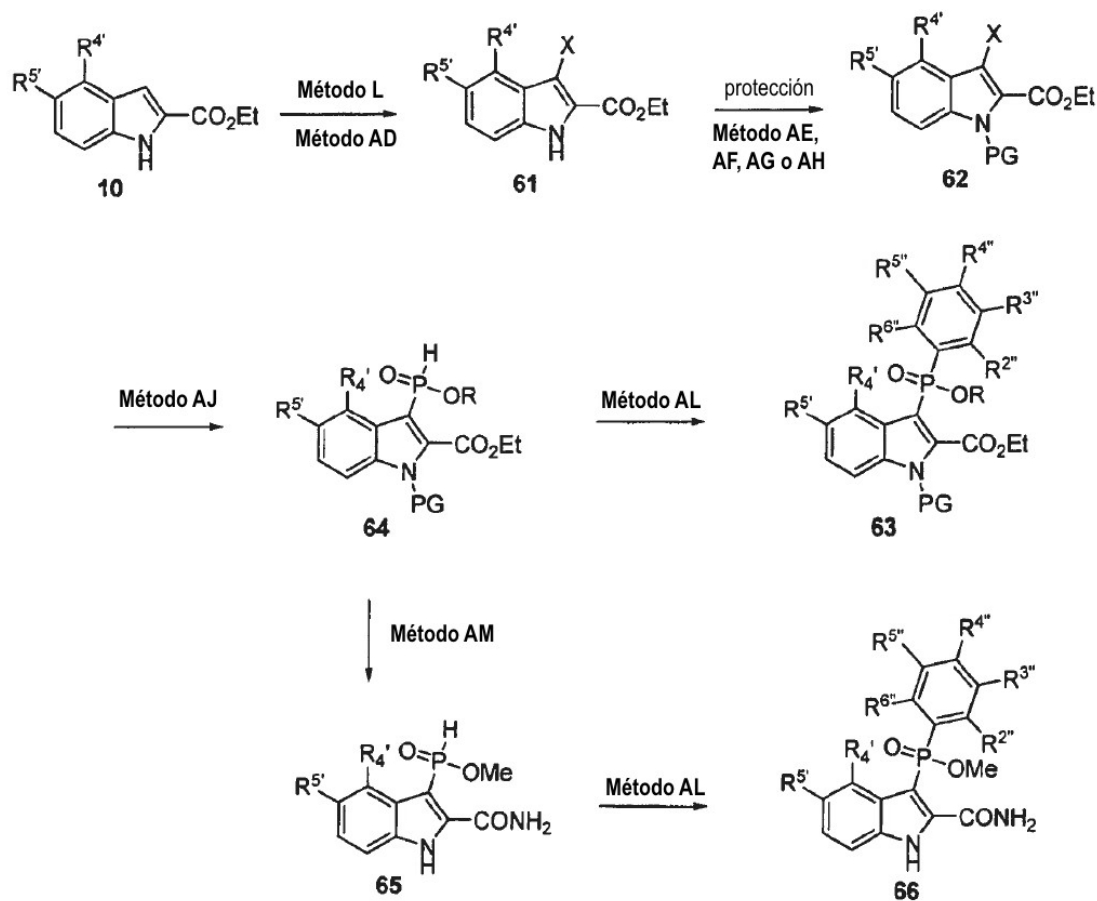
Reacción 13 a 11

30 Se añadió cuidadosamente piridina (1 eq.) a una solución vigorosamente agitada de cloroformiato de alquilo (1 eq.) y ácido arilfosfínico 13 (1 eq.) en diclorometano (2 ml/mmol) a temperatura normal. Una vez se hubo detenido la efervescencia, la solución se sometió a reflujo durante 15 minutos y a continuación se dejó enfriar hasta temperatura normal. La solución se vertió en ácido clorhídrico 0,1 M (1 ml/mmol) y la capa orgánica se separó. Después de lavar con agua y secar sobre Na₂SO₄, el disolvente se retiró a vacío para dar el compuesto n° 11. Sólido blanco. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 2,40 (s, 3H), 3,71 (d, *J* = 12,2 Hz, 3H), 6,58 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 576,0 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 14,0 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 7,80 (m, 2H), MS (ES⁻) *m/z* = 222.

Ciertos compuestos del actual ejemplo se prepararon mediante el esquema y los métodos posteriores.



Esquema 14: Acoplamiento de H-arilfosfinato con 3-yodoindol



5 Método AD

Se añadió a un matraz bajo argón el indol 10 (1 eq.), se añadió yodo (1,98 eq.), hidróxido potásico sólido (1 eq.) y DMF anhidra (4,5 ml/mmol). La mezcla de reacción se agitó 3 horas y a continuación se añadió agua y la suspensión se filtró a través de papel de filtro, el sólido se secó bajo presión reducida y se trituro/filtró en agua varias veces para dar después de secar bajo presión reducida el 3-yodoindol 61.

Método AE

- 5 Se añadieron yodo (1,98 eq.), hidróxido potásico sólido (1 eq.) y DMF anhidra (4,5 ml/mmol) a una solución agitada de indol 10 (1 eq) en diclorometano (3,5 ml/mmol) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó 18 horas y a continuación se añadió tampón de fosfato (pH=7) y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc : 1/1) para producir el indol protegido por Boc en N 62a.

Método AF

- 10 Se añadió hidruro sódico (1,2 eq.) en porciones a una solución agitada del indol 10 (1 eq) en DMF (3,5 ml/mmol) bajo nitrógeno y se enfrió hasta 0°C (baño de hielo). La mezcla de reacción se agitó 15 minutos hasta que cesaba el desprendimiento de gas y se añadió gota a gota cloruro de 4-metoxibencilo. La mezcla de reacción se agitó 18 horas y a continuación se añadió a 0°C una pequeña cantidad de agua. El medio de reacción se diluyó con agua/tampón de fosfato (pH=7). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas se lavaron con agua, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 98/2 a 1/1) para producir el indol protegido por p-metoxibencilo en N 62b.

Método AG

- 20 Se añadió NaH (60% en aceite, 1,2 eq.) en porciones a una solución agitada y enfriada (hasta aproximadamente 0°C) del indol-2-carboxilato de etilo 10 (1 eq.) en DMF (2 ml/mmol) bajo N_2 . Cuando se detenía el desprendimiento de gas, se añadía cloruro de bencenosulfonilo (1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 1 hora (control con TLC, eluyente diclorometano); a continuación se añadió cuidadosamente una pequeña cantidad de agua y la DMF se evaporó. El residuo bruto se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. Después del secado y la evaporación de los disolventes, el compuesto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: C_6H_{12} /EtOAc 9/1 a 7/3) para dar el N-fenilsulfonilindol 62c.

Método AH

- 30 Se añadió terc-butóxido potásico (1,5 eq.) a una solución agitada del indol 10 (1 eq.) en THF (3,5 ml/mmol) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó 15 minutos y a continuación se añadió cloruro de benzoilo (1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó 18 horas y a continuación se añadió agua. El THF se evaporó bajo presión reducida y la capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 3/1) para producir el indol protegido con Bz en N 62d.

Método AI

- 35 Una solución agitada de DMF desgasificada con N_2 , el 3-yodoindol protegido en N 62 (1 eq.), el H-arilfosfinato 23 ($\text{R} = \text{Me}$ o Et) (1,1 eq.), trietilamina (2 eq.) y Pd_2dba_3 (0,2 eq.) se calentó a 70°C o 90°C hasta que la reacción se acababa según el análisis por TLC o HPLC. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura normal y el disolvente se evaporó. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: típicamente éter de petróleo/EtOAc: 8/2) para producir el fosfinato de indol 63. (nota cuando PG=Boc se obtiene una mezcla de compuesto protegido por Boc y compuesto indólico desprotegido).

Método AJ

- 40 Se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 1,1 eq.) gota a gota mientras se mantenía la temperatura a alrededor de -90°C a una solución enfriada a -90°C (baño de acetona/nitrógeno líquido) del bromoindol 11 (1 eq.) en THF (5 ml/mmol) bajo nitrógeno. Después del final de la adición, el medio de reacción se agitó 5 min. a la misma temperatura y se añadió gota a gota clorodietilfosfito (1 eq.). Se dejó que la reacción se calentara hasta -20°C y a continuación se lavó rápidamente con un pequeño volumen de salmuera. A continuación, la capa orgánica se añadió inmediatamente a una solución agitada de HCl 0,5 M y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después de la decantación, la capa acuosa se extrajo con EtOAc varias veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y a continuación se concentraron bajo presión reducida y el residuo oleoso se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: DCM/EtOAc: 95/5) para producir el 3-H-fosfinato de indol 64.

Método AL

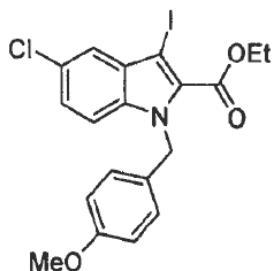
- 55 Se añadieron 3-yodo-5-metilcinamonitrilo (1,1 eq.), Et_3N (1 eq.) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,2 eq.) a una solución del 3-H-fosfinato de indol 64 o 65 bajo N_2 en acetonitrilo desgasificado. La reacción se calentó a 100°C hasta el final de la reacción (controlada mediante HPLC). La reacción se enfrió y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. A continuación, el residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice para producir el 3-H-fosfinato 63 o 66.

Método AM

En un tubo de presión, se disolvió el 3-H-fosfinato de indol 64 (1 eq.) en metanol, la solución se enfrió hasta 0°C y a continuación se saturó con amoníaco. A continuación, la reacción se calentó hasta 50°C bajo presión durante 18 horas. Después de enfriar, los disolventes se evaporaron. Se añadió agua y se realizó extracción con EtOAc. Las capas orgánicas se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron a vacío. El residuo se trituró en acetonitrilo y daba después de la filtración la 3-H-fosfinaoindolcarboxamida 65.

Producto intermedio 62b:

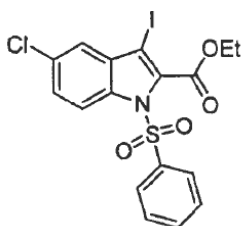
(4-Metoxibencil)-5-cloro-3-yodo-1H-indol-2-carboxilato de etilo.



El producto intermedio 62b se sintetizó según el método AF. Sólido blanco, ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,33 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 3,67 (s, 3H), 4,35 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 5,73 (s, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,97 (d, 2,1 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,72 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H).

Producto intermedio 62c:

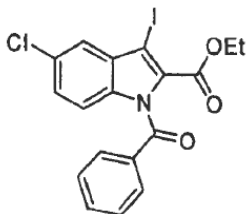
1-Fenilsulfonil-5-cloro-3-yodo-1H-indol-2-carboxilato de etilo.



El producto intermedio 62c se sintetizó según el método AG. ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,40 (t, 3H), 4,50 (q an, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,52-7,80 (m, 4H), 8,00 (m, 3H). MS (ESI, EI-) *m/z* = 488 (M-H⁺).

Producto intermedio 62d:

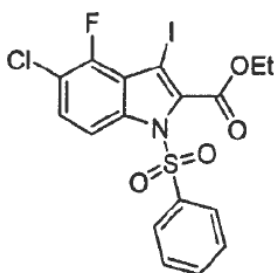
1-Benzoil-5-cloro-3-yodo-1H-indol-2-carboxilato de etilo.



El producto intermedio 62d se sintetizó según el método AH. Sólido amarillo claro, ¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz) δ 1,03 (t, *J* = 9,4 Hz, 3H), 3,88 (q, *J* = 9,4 Hz, 2H), 7,52-7,71 (m, 8H). MS (ESI, EI+) *m/z* = 476 (M+Na⁺), MS (ES-) *m/z* = 452.

Producto intermedio 62e

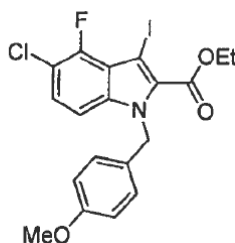
1-Fenilsulfonil-5-cloro-4-fluoro-3-yodo-1H-indol-2-carboxilato de metilo



El producto intermedio 62e se sintetizó según el método AG. Sólido beige, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,41 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 4,51 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 7,63-7,71 (m, 3H), 7,78-7,82 (m, 1H), 7,89-7,91 (d, 1H), 8,00-8,03 (m, 2H), ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 376 MHz) δ -125,60 (d, 1F). MS (ESI $^-$) m/z = 506,12 (M-H) $^-$ 30%, 380,21 (M-I) $^-$ 100%, 382,21 (M-I) $^-$ 35%.

Producto intermedio 62h:

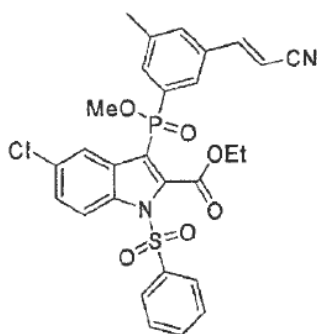
1-(4-Metoxibencil)-4-fluoro-5-cloro-3-yodo-1H-indol-2-carboxilato de metilo.



El producto intermedio 62h se sintetizó según el método AF. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 3,67 (s, 3H), 4,34 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 5,68 (s, 2H), 6,82 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,45 (dd, J = 7,0 y 9,2 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,8 Hz, 1H), ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 377 MHz) δ -126,1 (s, 1F). MS (ESI, EI $^+$) m/z = 487.

Compuesto de referencia 63b:

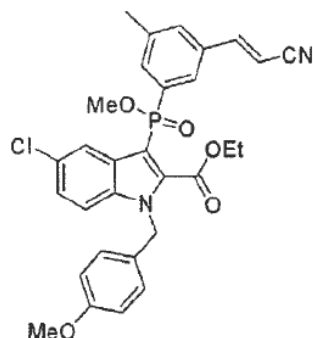
Éster etílico de ácido 1-bencenosulfonil-5-cloro-3-[metil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil-1H-indol-2-carboxílico.



El compuesto 63b se sintetizó según el método AI. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,33 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 2,65 (s, 3H), 3,69 (d, J = 11,7 Hz, 3H), 4,41 (m, 2H), 6,52 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 9,0 y 2,2 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 13,6 Hz, 1H), 7,60-7,71 (m, 3H), 7,76-7,81 (m, 3H), 7,85 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 8,04-8,09 (m, 3H). MS (ES $^+$) m/z = 583 (MH $^+$)

Compuesto de referencia 63c:

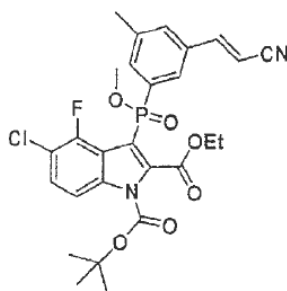
Éster etílico de ácido 1-(4-metoxibencil)-5-cloro-3-[metil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil-1H-indol-2-carboxílico.



5 El compuesto 63c se sintetizó según el método A1. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -Acetona, 400 MHz) δ 1,18 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 2,39 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,76 (d, J = 11,4 Hz, 3H), 4,26 (m, 2H), 5,63 (s, 2H), 6,35 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,14 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,35 (dd, J = 9,0 y 2,2 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 7,67 (dd, J = 8,9 y 1,9 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,75 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 8,24 (d, J = 2,2 Hz, 1H). MS (ES $^+$) m/z = 563 (MH $^+$).

Compuesto de referencia 63f:

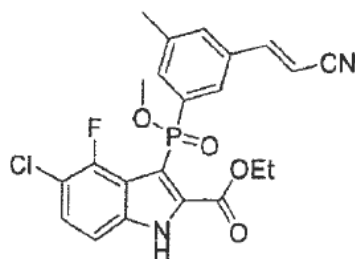
Éster etílico de ácido 1-(terc-butilcarbamato)-5-cloro-4-fluoro-3-[metil-3-(E)-2-cianovinil-5-metilfenil]fosfinoil)-1H-indol-2-carboxílico.



10 El compuesto 63f se sintetizó según el método A1. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 1,62 (s, 9H), 2,35 (s, 3H), 3,66 (d, J = 11,6 Hz, 3H), 4,37 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 6,51 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 7,58-7,65 (m, 2H), 7,69-7,77 (m, 3H), 7,94 (d, J = 9,5 Hz, 1H), ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 377 MHz) δ -116,0 (s, 1F), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 162 MHz) δ 23,42 (s, 1P). MS (ESI, EI $^+$) m/z = 561 (M+H $^+$).

15 Compuesto de referencia 63g:

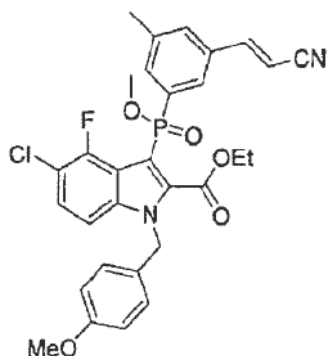
Éster etílico de ácido 5-cloro-4-fluoro-3-[metil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil)-1H-indol-2-carboxílico.



20 El compuesto 63g se sintetizó según el método A1. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 2,35 (s, 3H), 3,58 (d, J = 11,6 Hz, 3H), 4,24 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 6,49 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 7,38-7,82 (m, 6H), 13,19 (s an, 1H), ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 376 MHz) δ -115,0 (s, 1F), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 162 MHz) δ 25,24 (s, 1P). MS (ESI, EI $^+$) m/z = 461 (M+H $^+$).

Compuesto de referencia 63h:

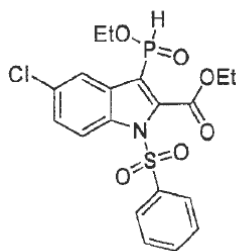
Éster etílico de ácido 1-(4-metoxibencil)-5-cloro-4-fluoro-3-[metil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil)-1H-indol-2-carboxílico.



- 5 El compuesto 63h se sintetizó según el método AI. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 2,35 (s, 3H), 3,61 (d, $J = 11,6$ Hz, 3H), 3,70 (s, 3H), 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 5,43 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 5,48 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 6,48 (d, $J = 16,7$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,12 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,46 (dd, $J = 6,8$ y 8,8 Hz, 1H), 7,55-7,79 (m, 5H), ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 377 MHz) δ -116,7 (s, 1F), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 162 MHz) δ 24,55 (s, 1P). MS (ESI, EI^+) $m/z = 581$ ($\text{M}+\text{H}^+$).

Producto intermedio 64a:

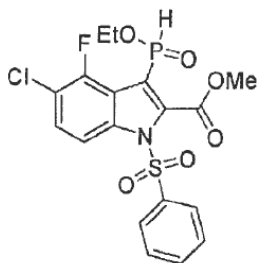
Éster etílico de ácido 1-bencenosulfonil-5-cloro-3-etoxihidrogenofosfinil-1H-indol-2-carboxílico.



- 10 El producto intermedio 64a se sintetizó según el método AJ. Aceite espeso amarillo claro, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ 1,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,37 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 4,1 (m, 2H), 4,46 (q, $J = 7,2$ Hz, 3H), 7,58 (dd, $J = 9,0$ y 2,1 Hz, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,80 (d, $J = 60$ 9,6 Hz, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,97 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 8,11 (m, 3H), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 162 MHz) δ 13,43. MS (ES^+) $m/z = 456$ (MH^+).

Producto intermedio 64b:

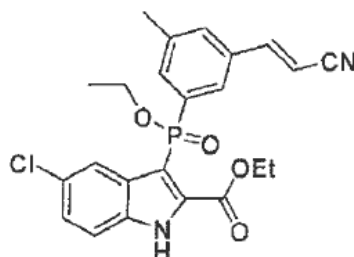
- 15 Éster metílico de ácido 1-bencenosulfonil-5-cloro-4-fluoro-3-etoxihidrogenofosfinil-1H-indol-2-carboxílico.



El producto intermedio 64b se sintetizó según el método AJ. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ 1,20 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H), 3,99 (s, 3H), 4,03 (m, 2H), 4,10 (m, 2H), 7,70 (m, 4H), 7,71 (m, 2H), 7,79 (dd, $J = 61$ 6,8 y 4,8 Hz, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 121,49 MHz) δ 12,42 ($J_{\text{P-F}} 12,6$ Hz). MS (ES^+) $m/z = 460$ (MH^+).

- 20 Compuesto de referencia 63f:

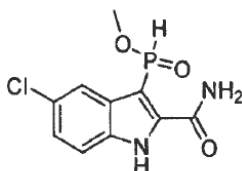
Éster etílico de ácido 5-cloro-3-[etil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil-1H-indol-2-carboxílico.



El compuesto 63f se sintetizó según el método AL. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,09 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 1,26 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 2,34 (s, 3H), 3,99 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 6,48 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 7,39 (dd, J = 8,8 y 2,2 Hz, 1H), 7,59 (m, 2H), 7,71 (m, 3H), 8,39 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 12,93 (s an, 1H). MS (ES) m/z = 597 (MH^+).

5 Producto intermedio 65a:

5-Cloro-3-metoxihidrogenofosfinil-1H-indol-2-carboxamida.



10 El producto intermedio 65a se sintetizó según el método AM. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ 3,71 (d, J = 12,6 Hz, 3H), 7,35 (dd, J = 8,7 y 2,1 Hz, 1H), 7,60 (dd, J = 8,7 y 1,8 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,99 (dd, J = 616,8 y 5,4 Hz, 1H), 8,00 (s an, 1H), 9,28 (s an, 1H), 12,71 (s an, 1H), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 121,49 MHz) δ 22,38. MS (ES $^-$) m/z = 271 (M-H).

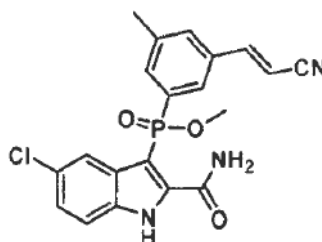
Producto intermedio 65b:

5-Cloro-4-fluoro-3-metoxihidrogenofosfinil-1H-indol-2-carboxamida

15 El producto intermedio 65b se sintetizó según el método AM. Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ 3,72 (d, J = 13,2 Hz, 3H), 7,45 (m, 2H), 7,99 (dd, J = 616,8 y 5,4 Hz, 1H), 8,08 (s an, 1H), 9,96 (s an, 1H), 13,0 (s an, 1H), ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 121,49 MHz) δ 22,79 (dd, J = 28,8 y 4,6 Hz). MS (ES $^-$) m/z = 289 (M-H).

Compuesto 66a:

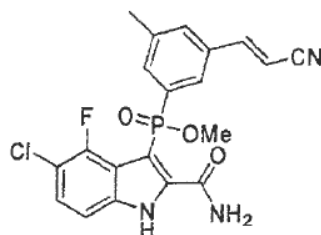
5-Cloro-3-(metil-3-(E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil-1H-indol-2-carboxamida.



20 El compuesto 66a se sintetizó según el método AL. Sólido blanco, ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2,40 (s, 3H), 3,88 (d, J = 11,7 Hz, 3H), 5,89 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 5,97 (s an, 1H), 7,33-7,67 (m, 7H), 10,46 (s, 1H), 10,89 (s an, 1H), ^{31}P NMR (CDCl_3 , 121,49 MHz) δ 31,54. MS (ES $^+$) m/z = 414 (MH^+).

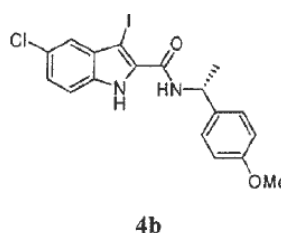
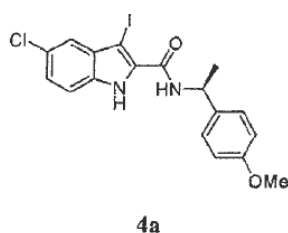
Compuesto de referencia 66b:

5-Cloro-4-fluoro-3-[metil-3-((E)-2-cianovinil)-5-metilfenil]fosfinoil-1H-indol-2-carboxamida.



El compuesto 66b se sintetizó según el método AL. Sólido blanco, ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2,42 (s, 3H), 3,88 (d, $J = 12,0$ Hz, 3H), 6,38 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 7,20 (s an, 1H), 7,42 (dd, $J = 8,8$ y $6,7$ Hz, 1H), 7,61-7,66 (m, 2H), 7,74 (m, 2H), 7,89 (m, 1H), 11,24 (s, 1H), 12,07 (s an, 1H), ^{31}P NMR (CDCl_3 , 121,49 MHz) δ 30,29, ^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 282,4 MHz) δ -115,0. MS (ES^+) $m/z = 432$ (MH^+).

Productos intermedios 4a y 4b:

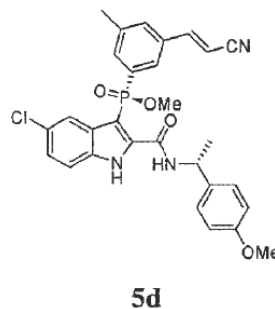
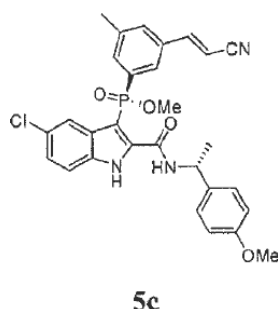


Se añadieron HOBt (1 eq.), α -metil-p-metoxibencilamina (R) o (S) (1 eq.) y finalmente EDCI (1 eq.) a una solución de ácido 3-yodo-5-cloroindol-2-carboxílico (1 eq.) en DMF (7 ml/mmol) bajo nitrógeno. El medio de reacción se agitó durante 18 horas y a continuación se añadió agua. El sólido precipitado se filtró, se enjuagó con agua, se solubilizó con EtOAc, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó bajo presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 95/5 a 8/2) para producir el indol 4a o 4b.

4a: 5-cloro-3-yodo-N-((S)-1-(4-metoxifenil)etil)-1H-indol-2-carboxamida. Sólido blancuzco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,48 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 3,73 (s, 3H), 5,10 (m, 1H), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,27 (dd, $J = 8,7$ y $2,0$ Hz, 1H), 7,35-7,38 (m, 3H), 7,45 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,37 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 12,15 (s an, 1H), MS (ES^+) $m/z = 455$ (MH^+).

4b: 5-cloro-3-yodo-N-((R)-1-(4-metoxifenil)etil)-1H-indol-2-carboxamida: Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,48 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 3,73 (s, 3H), 5,10 (m, 1H), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,27 (dd, $J = 8,7$ y $2,1$ Hz, 1H), 7,35-7,38 (m, 3H), 7,45 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,37 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 12,20 (s an, 1H), MS (ES) $m/z = 455$ (MH^+).

Productos intermedios 5c y 5d:



Una solución agitada de DMF desgasificada con N_2 , el 3-yodoindol 4b (1 eq.), el H-arilfosfinato nº 11 (1,1 eq.), trietilamina (2 eq.) y Pd_2dba_3 (0,2 eq.) se calentó a 70°C hasta que la reacción se acababa según el análisis por TLC o HPLC. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura normal y el disolvente se evaporó. Los diastereoisómeros obtenidos se separan mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc: 9/1 a 1/1) para producir sucesivamente el fosfinato 5c y 5d.

5c: 3-(E)-2-Cianovinil-5-metilfenil-(2-((R)-1-(4-metoxifenil)etilcarbamoyl)-5-cloro-1H-indol-3-il)-3-fosfinato de metilo (R): Sólido blanco, ^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 1,48 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 2,24 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,75 (d, $J = 1,8$ Hz, 3H), 5,14 (m, 1H), 6,52 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,30 (dd, $J = 8,5$ y $2,1$ Hz, 1H), 7,36 (d,

$J = 8,5$ Hz, 2H), 7,56 (dd, $J = 8,8$ y 1,5 Hz, 1H), 7,61 (m, 2H), 7,48 (dd, $J = 2,2$ y 8,9 Hz, 1H), 7,70 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,80 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H), 11,12 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 12,76 (s an, 1H), MS (ES⁺) $m/z = 548$ (M+H⁺).

5

Compuesto 66a (R):

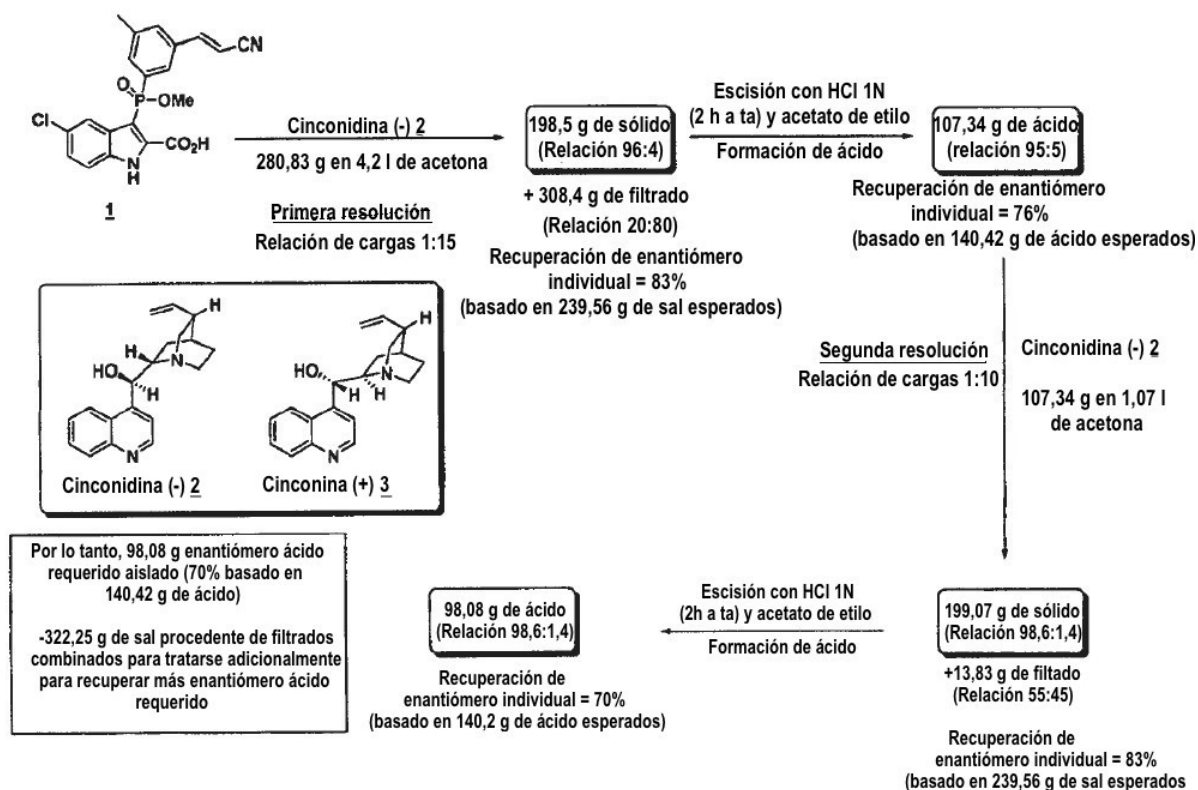
10

15

Ejemplo 2

20

Resolución inicial a una escala de 280.82 g de ácido racémico



25

1. Resolución inicial a una escala de 280.82 g de ácido racémico

Primera resolución - usando cinchonidina (-) 2

El ácido libre del indol 1 (280,83 g, 675,61 mol, Esquema 15) se suspendió en acetona (4,2 l) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado. Se añadió cinconidina (-) (198,89 g, 675,61 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 1 h más, se observaba la precipitación de un sólido blanco y la suspensión se agitaba a temperatura normal durante 2 h más (total 4 h). Después de este tiempo, el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (200 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 198,5 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 96:4) y 308,4 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 20:80).

Escisión ácida de sal

La sal del indol 1 parcialmente resuelta (198,5 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral 96:4) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (3 l) y HCl 1 N (3 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido parcialmente resuelto como un sólido blancuzco (107,34 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 95:5)

Segunda resolución - usando cinconidina (-) 2

El indol ácido 1 parcialmente resuelto (107,34 g, 258,78 mmol, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 95:5) se suspendió en acetona (1,07 l) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió cinconidina (-) 2 (76,18 g, 258,78 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 1 h más, se observaba la precipitación de un sólido blanco y la suspensión se agitaba a temperatura normal durante 2 h más (total 4 h). Después de este tiempo el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (200 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 199,07 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 98,6:1,4) y 13,83 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 55:45).

Escisión ácida de sal

La sal resuelta (199,07 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 98,6:1,4) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (3 l) y HCl 1 N (3 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (98,08 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 98,6:1,4).

¹H NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz): δ 2,33 (3H, s, Ar-CH₃), 3,70 (3H, d, *J* 11,72 Hz, P-OCH₃), 6,50 (1H, d, *J* 16,84 Hz, CH=CHCN), 7,34 (1H, dd, *J* 1,95 Hz, *J* 8,79 Hz), 7,57 (1H, d, *J* 8,56 Hz), 7,62-7,79 (3H, m), 7,82-7,85 (1H, m o d con *J* 13,43 Hz), 7,98 (1H, m), 13,02 (1H, s, CO₂H), 14,36 (1H, s an, NH); ³¹P NMR (*d*₆-DMSO, 161,8 MHz): δ 33,42; *m/z* (ES⁺) 415 (M+H)⁺.

Recuperación

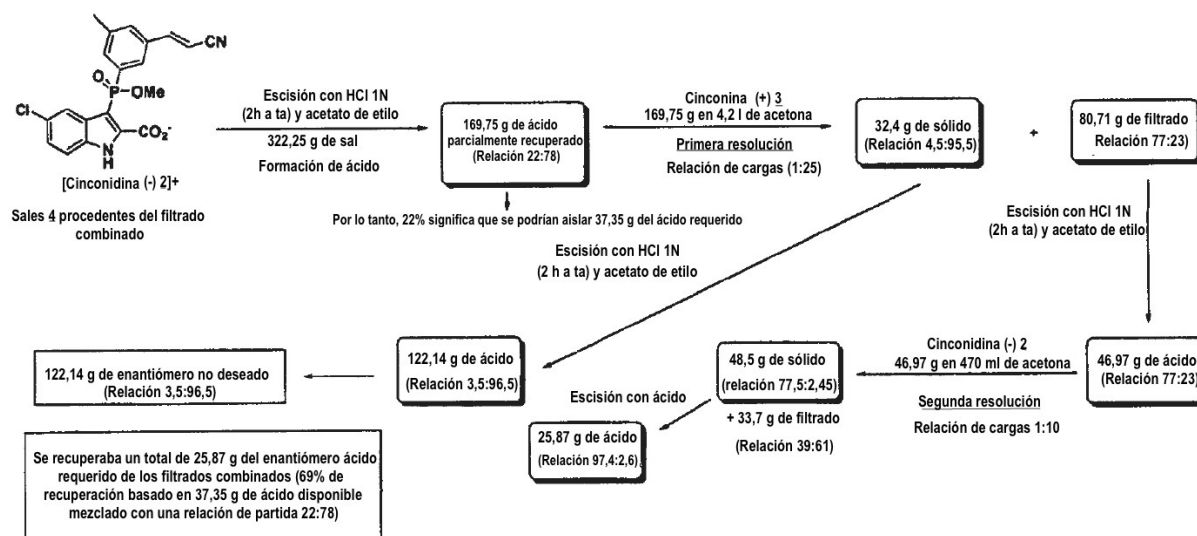
Por lo tanto, se aislaron 98,08 g del enantiómero ácido requerido (70% de recuperación basado en 140,42 g del enantiómero ácido disponible a partir de 280,83 g del ácido racémico). Además, se trataron 322,25 g adicionales de sal procedente de los filtrados combinados de las dos resoluciones 4 (308,4 g + 13,85 g) para recuperar más enantiómero requerido.

2. Recuperación del filtrado

Escisión ácida de sal

La sal combinada parcialmente resuelta 4 (322,25 g) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (4,8 l) y HCl 1 N (4,8 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h (Esquema 16). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (4 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido parcialmente resuelto como un sólido blancuzco (169,75 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 22:78)

Recuperación del enantiómero requerido del filtrado



Esquema 16

Primera resolución - usando cinconina (+) 3

El indol ácido parcialmente resuelto (169,75 g, 409,25 mol, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 22:78) se suspendió en acetona (3,06 l) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió cinconina (+) 3 (120,48 g, 409,25 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 5 min. más, se observaba una precipitación rápida de un sólido blanco y la suspensión espesa requería acetona adicional (1,14 l - volumen total de acetona usado = 4,2 l) para permitir la agitación de la mezcla de reacción a temperatura normal durante 3 h más (total 4 h). Después de este tiempo el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (150 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 324,2 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 4,5:95,5) y 80,71 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 77:23).

Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero no deseado

La sal parcialmente resuelta (324,2 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 4,5:95,5) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (4,8 l) y HCl 1 N (4,8 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (3 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (122,14 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 3,5:96,5).

^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ 2,33 (3H, s, Ar-CH₃), 3,70 (3H, d, J 11,72 Hz, P-OCH₃), 6,50 (1H, d, J 16,84 Hz, CH=CHCN), 7,34 (1H, dd, J 1,95 Hz, J 8,79 Hz), 7,57 (1H, d, J 8,56 Hz), 7,62-7,79 (3H, m), 7,82-7,85 (1H, m o d con J 13,43 Hz), 7,98 (1H, m), 13,02 (1H, s, CO₂H), 14,36 (1H, s an, NH); ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 161,8 MHz): δ 33,47 m/z (ES⁺) 415 (M+H)⁺.

Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero requerido del filtrado

La sal parcialmente resuelta (80,71 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 77:23) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (1,21 l) y HCl 1 N (1,21 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (1 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido parcialmente resuelto como un sólido blancuzco (46,97 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 77:23).

Segunda resolución - usando cinconidina (-) 2

El indol ácido parcialmente resuelto (46,97 g, 113,24 mmol, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 77:23) se suspendió en acetona (470 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió cinconidina (-) 2 (33,34 g, 113,24 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 1 h más, se observaba la precipitación de un sólido blanco y la suspensión se agitaba a temperatura normal durante 2 h más (total 4 h). El sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (100 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 48,5 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 97,5:2,5).

y 33,7 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 39:61).

Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero requerido del filtrado

La sal parcialmente resuelta (48,5 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 97,5:2,5) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (728 ml) y HCl 1 N (728 ml) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 3 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (700 ml) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (25,87 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 97,4:2,6)

^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ 2,33 (3H, s, Ar-CH₃), 3,70 (3H, d, J 1 1,72 Hz, P-OCH₃), 6,50 (1H, d, J 16,84 Hz, CH=CHCN), 7,34 (1H, dd, J 1,95 Hz, J 8,79 Hz), 7,57 (1H, d, J 8,56 Hz), 7,62-7,79 (3H, m), 7,82-7,85 (1H, m o d con J 13,43 Hz), 7,98 (1H, m), 13,02 (1H, s, CO₂H), 14,36 (1H, s an, NH); ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 161,8 MHz): 833,42; m/z (ES⁺) 415 (M+H)⁺.

Recuperación

Por lo tanto, se recuperaban del filtrado 25,87 g de enantiómero requerido.

Recuperación global de enantiómero ácido requerido:-

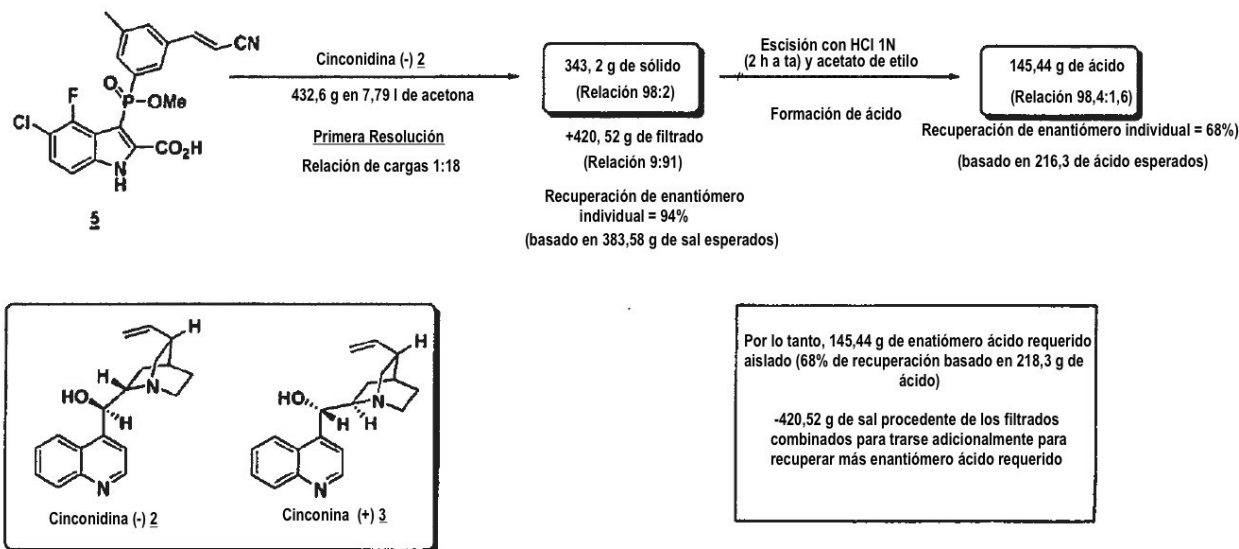
98,08 g + 25,87 g = 123,95 g (de los 140,42 g posible procedentes de 280,83 g de ácido racémico) = 88% de rendimiento.

Ejemplo 3

Resolución química de 3-fosfoindoles de Fórmula III/IV

La resolución del indol ácido libre de Fórmula III/IV se ha realizado hasta aquí sobre 432,6 g de 5 usando cinconidina (-) 2. Este procedimiento se representa en el Esquema 17 posteriormente.

Resolución inicial a una escala de 432,6 g de ácido racémico



Esquema 17

Procedimiento experimental

1. Resolución inicial a una escala de 432,6 g del ácido racémico

Resolución - usando cinconidina (-) 2

El indol ácido libre 5 (432,6 g, 1,0 mol) se suspendió en acetona (7,79 l) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió cinconidina (-) 2 (294,39 g, 1,0 mol) en una porción y la suspensión se agitó a temperatura normal durante 4 h. Después de este tiempo el sólido (no se observaba precipitación, siempre estaba presente una suspensión a esta escala) se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (300 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío

para dar 343,2 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 98:2) y 420,52 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 9:91).

Escisión ácida de sal

5 La sal parcialmente resuelta del indol **5** (343,2 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral 98:2) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (5,2 l) y HCl 1 N (5,2 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2,7 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (145,44 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 98,4:1,6).

10 ^1H NMR δ_{H} (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,35 (3H, s, Ar-CH₃), 3,78 (3H, d, POCH₃), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,46 (2H, d, Ar-H), 7,66 (1H, d, CH=CHCN), 7,69, 7,81 (2H, 2 x d, H-6, H-7), 7,77 (1H, s, Ar-H), 13,63 (1H, s, N-H), 15,70 (1H, s an, COOH); ^{31}P NMR δ_{P} (162 MHz, d_6 -DMSO): 36,44 (1P, s); ^{19}F NMR δ_{F} (376 MHz, d_6 -DMSO): -114,27 (1F, s); m/z (ESI⁺): 433,0 (MH⁺, 100%), 435,0 (MH⁺, 35%).

Recuperación

15 Por lo tanto, se aislaron 145,44 g del enantiómero ácido requerido (68% de recuperación basado en 216,3 g del enantiómero ácido disponible a partir de 432,6 g de ácido racémico). Además, se tratan 420,52 g adicionales de sal procedente del filtrado para recuperar más enantiómero requerido.

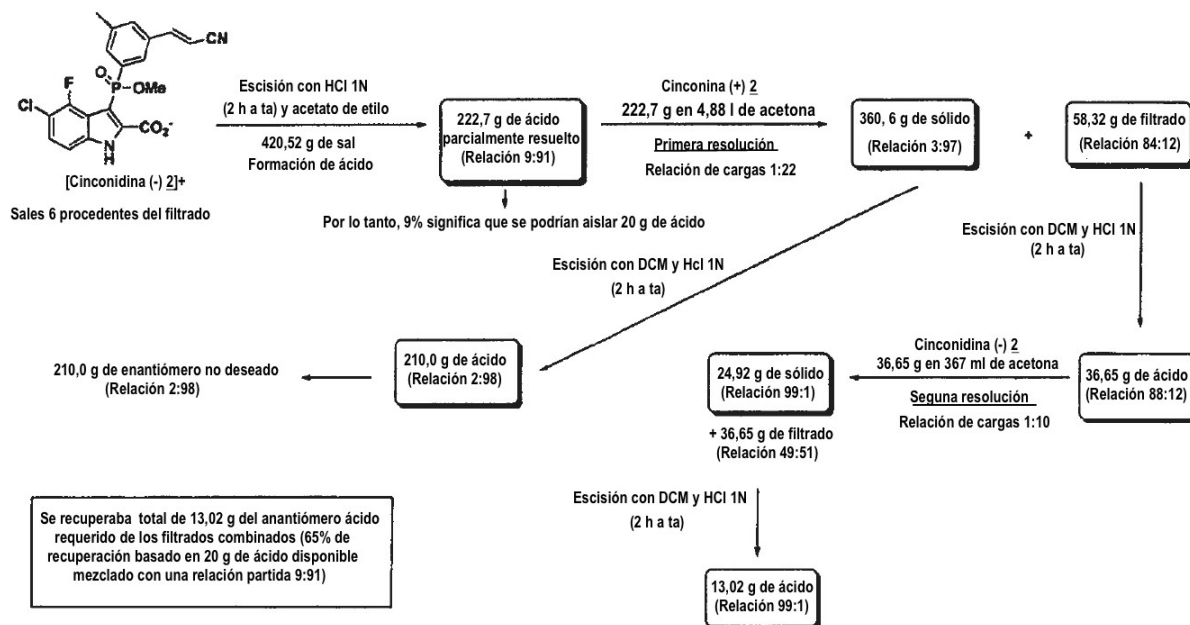
2. Recuperación del filtrado

Escisión ácida de sal

20 La sal combinada parcialmente resuelta **4** (420,52 g) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (6,31 l) y HCl 1 N (6,31 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h (Esquema 18). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (3 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido parcialmente resuelto como un sólido blancuzco (222,7 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 9:91)

25 (222,7 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 9:91)

Recuperación del enantiómero requerido del filtrado



Esquema 18

Primera resolución - usando cinconina (+) **3**

30 El indol ácido parcialmente resuelto (222,7 g, 409,25 mol, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 9:91) se suspendió en acetona (4,38 l) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió

cinconina (+) **3** (120,48 g, 409,25 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 5 min. adicionales, se observaba la precipitación rápida de un sólido blanco y la suspensión espesa requería acetona adicional (0,5 l - volumen total de acetona usado = 4,88 l) para permitir la agitación de la mezcla de reacción a temperatura normal durante 3 h más (total 4 h). Después de este tiempo el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (400 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 360,6 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 3:97) y 58,32 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 84:12).

Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero no deseado

- 10 La sal parcialmente resuelta (360,6 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 3:97) se suspendió en una mezcla de diclorometano (5,4 l) and HCl 1 N (5 l) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (2 l) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (210,0 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación= 2:98).

^1H NMR δH (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,35 (3H, s, Ar-CH₃), 3,78 (3H, d, POCH₃), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,46 (2H, d, Ar-H), 7,66 (1H, d, CH=CHCN), 7,69, 7,81 (2H, 2 x d, H-6, H-7), 7,77 (1H, s, Ar-H), 13,63 (1H, s, N-H), 15,70 (1H, s an, COOH); ^{31}P NMR δP (162 MHz, d_6 -DMSO): 36,44 (1P, s); ^{19}F NMR δF (376 MHz, d_6 -DMSO): -114,27 (1F, s); m/z (ESI⁺): 433,0 (MH⁺, 100%), 435,0 (MH⁺, 35%).

- 20 Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero requerido del filtrado

La sal parcialmente resuelta (58,32 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 84:12) se suspendió en una mezcla de diclorometano (875 ml) y HCl 1 N (875 ml) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (400 ml) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido parcialmente resuelto como un sólido blancuzco (36,65 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 88:12).

Segunda resolución - usando cinconidina (-) **2**

- 30 El indol ácido parcialmente resuelto (36,65 g, 85,0 mmol, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 88:12) se suspendió en acetona (367 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió cinconidina (-) **2** (25,02 g, 85,0 mmol) en una porción y, después de 1 h, se observaba una solución transparente. Después de 1 h más, se observaba la precipitación de un sólido blanco y la suspensión se agitaba a temperatura normal durante 2 h más (total 4 h). El sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con acetona (100 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 24,92 g de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 99:1) y 36,65 g de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 49:51).

Escisión ácida de sal para obtener el enantiómero requerido del filtrado

- 40 La sal parcialmente resuelta (24,92 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 99:1) se suspendió en una mezcla de diclorometano (374 ml) y HCl 1 N (374 ml) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 2 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (200 ml) y los extractos orgánicos que contenían producto se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blancuzco (13,02 g, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 99:1).

- 45 ^1H NMR δH (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,35 (3H, s, Ar-CH₃), 3,78 (3H, d, POCH₃), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,46 (2H, d, Ar-H), 7,66 (1H, d, CH=CHCN), 7,69, 7,81 (2H, 2 x d, H-6, H-7), 7,77 (1H, s, Ar-H), 13,63 (1H, s, N-H), 15,70 (1H, s an, COOH); ^{31}P NMR δP (162 MHz, d_6 -DMSO): 36,44 (1P, s); ^{19}F NMR δF (376 MHz, d_6 -DMSO): -114,27 (1F, s); m/z (ESI⁺): 433,0 (MH⁺, 100%), 435,0 (MH⁺, 35%).

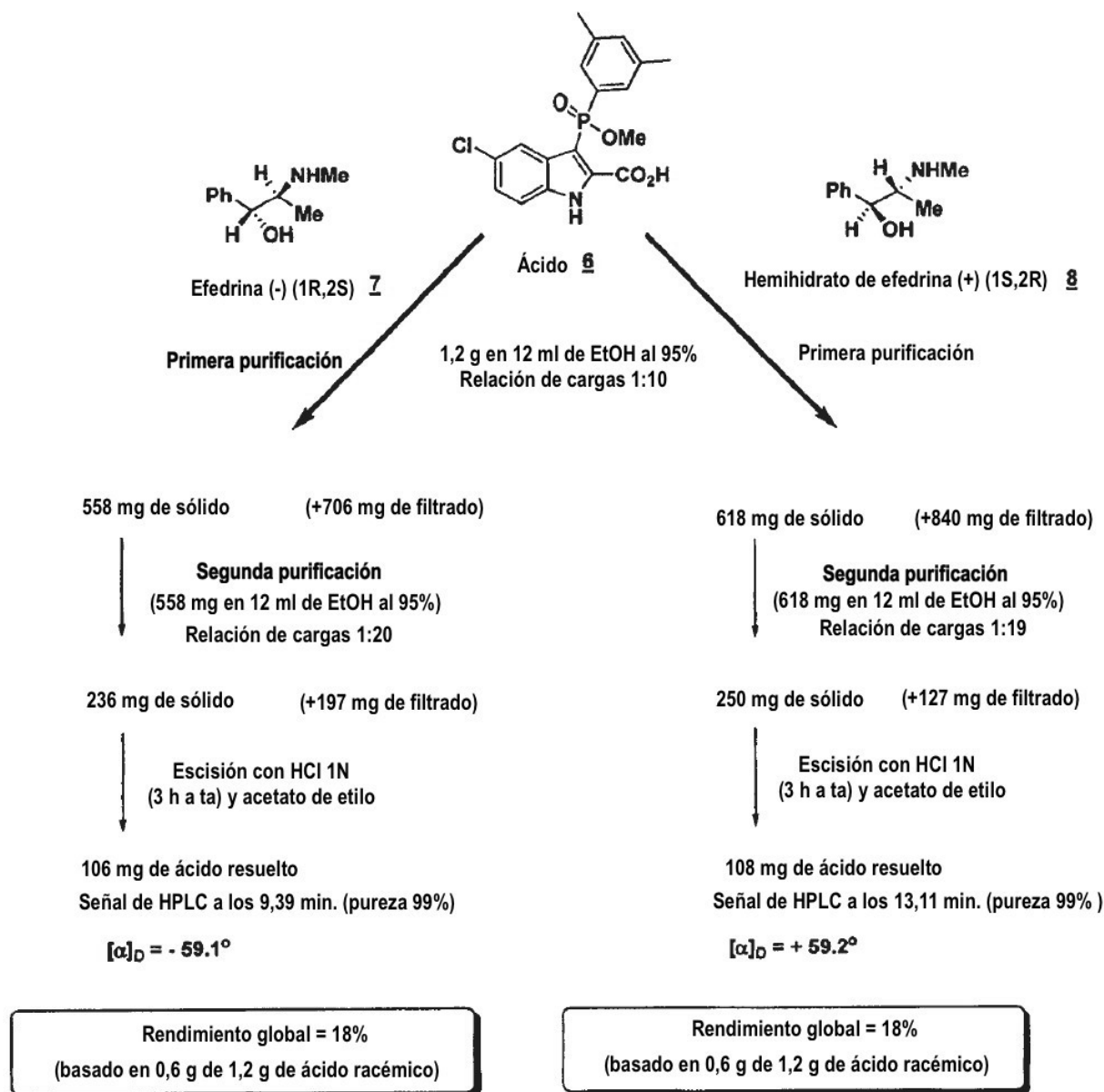
Recuperación

Por lo tanto, se recuperaban del filtrado 13,02 g del enantiómero requerido.

Recuperación global del enantiómero ácido requerido:-

- 50 145,44 g + 13,02 g = 158,46 g (de los 216,3 g posibles procedentes de 432,6 g de ácido racémico) = 73% de rendimiento.

La resolución del ácido libre del 3-fosfoindol **6** se ha realizado sobre 1,02 g del compuesto usando efedrina (1R,2S) **7** y hemihidrato de efedrina (1S,2R) **8** en EtOH al 95% (Esquema 19). El principio de esta resolución es el mismo que el descrito anteriormente utilizando las bases de cinconidina.



Esquema 19

Ejemplo 4

1. Primera resolución - usando Efedrina (-) (1R,2S) **7**

- 5 3-fosfoindol en forma de ácido libre **6** (1,2 g, 3,17 mmol) se suspendió en etanol al 95% (12 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió efedrina (-) (1R,2S) **7** (0,52 g, 3,17 mmol) en una porción y, después de 5 min., se observaba una solución transparente. Después de 5 min. más, se observaba la precipitación rápida de un sólido blanco y la agitación se continuaba a temperatura normal durante 3 h. Después de este tiempo el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con etanol al 95% (2 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 558 mg de sólido precipitado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 14:86) y 706 mg de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 74:26).

Segunda resolución

- 15 La sal parcialmente resuelta de **6** (558 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral 14:86) se suspendió en etanol al 95% (12 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente durante 3 h. Después de este tiempo el sólido se aisló mediante filtración y se lavó con etanol al 95% (2 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 236 mg de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 1:99) y 197 mg de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 25:75).

Escisión ácida de sal

La sal resuelta de 6 (236 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral 1:99) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (7 ml) y HCl 1 N (7 ml) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 3 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo (se requerían acetato de etilo (3 ml) y HCl 1 N (3 ml) adicionales para transferir el material desde el matraz) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 6 ml) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blanco (106 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 1:99, $[\alpha]_D = -59,1^\circ$).

^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ 52,27 (6H, s, 2 x Ar-CH₃), 3,71 (3H, d, J 11,72 Hz, P-OCH₃), 7,2-7,30 (1H, m), 7,35-7,45 (m, 3H), 7,57-7,6 (m, 1H), 7,78-7,79 (m, 1H), 12,99 (1H, s, CO₂H), 14,73 (1H, s an, NH); ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 161,8 MHz): δ 35,41; m/z (ES⁺) 378 (M+H)⁺.

2. Primera resolución - Usando efedrina (+) (1S,2R) 8

El indol en forma de ácido libre 6 (1,2 g, 3,17 mmol) se suspendió en etanol al 95% (12 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente. Se añadió efedrina (+) (1S,2R) 8 (0,55 g, 3,17 mmol) en una porción y, después de 5 min., se observaba una solución transparente. Después de 5 min. más, se observaba la precipitación rápida de un sólido blanco y la agitación se continuaba a temperatura normal durante 3 h. Después de este tiempo el sólido precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con etanol al 95% (0,5 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 618 mg de sólido precipitado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 94:6) y 840 mg de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 25:75).

Segunda resolución

La sal parcialmente resuelta (618 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral 94:6) se suspendió en etanol al 95% (12 ml) y se agitó a temperatura normal en un matraz cerrado herméticamente durante 3 h. Después de este tiempo el sólido se aisló mediante filtración y se lavó con etanol al 95% (0,5 ml). El filtrado se concentró a vacío y tanto el sólido precipitado como el residuo procedente del filtrado se secaron durante la noche bajo vacío para dar 250 mg de sólido (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 100:0) y 127 mg de filtrado (pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 85:15).

Escisión ácida de sal

La sal resuelta de 6 (250 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral 100:0) se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (7 ml) y HCl 1 N (7 ml) y se agitó vigorosamente a temperatura normal durante 3 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo (se requerían acetato de etilo (3 ml) y HCl 1 N (3 ml) adicionales para transferir el material desde el matraz) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 6 ml) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el ácido resuelto como un sólido blanco (108 mg, pureza mediante análisis por HPLC quiral, relación = 100:0, $[\alpha]_D = +59,2^\circ$).

^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ 2,27 (6H, s, 2 x Ar-CH₃), 3,71 (3H, d, J 11,72 Hz, P-OCH₃), 7,2-7,30 (1H, m), 7,35-7,45 (m, 3H), 7,57-7,6 (m, 1H), 7,78-7,79 (m, 1H), 12,99 (1H, s, CO₂H), 14,73 (1H, s an, NH); ^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 161,8 MHz): δ 35,41; m/z (ES⁺) 378 (M+H)⁺.

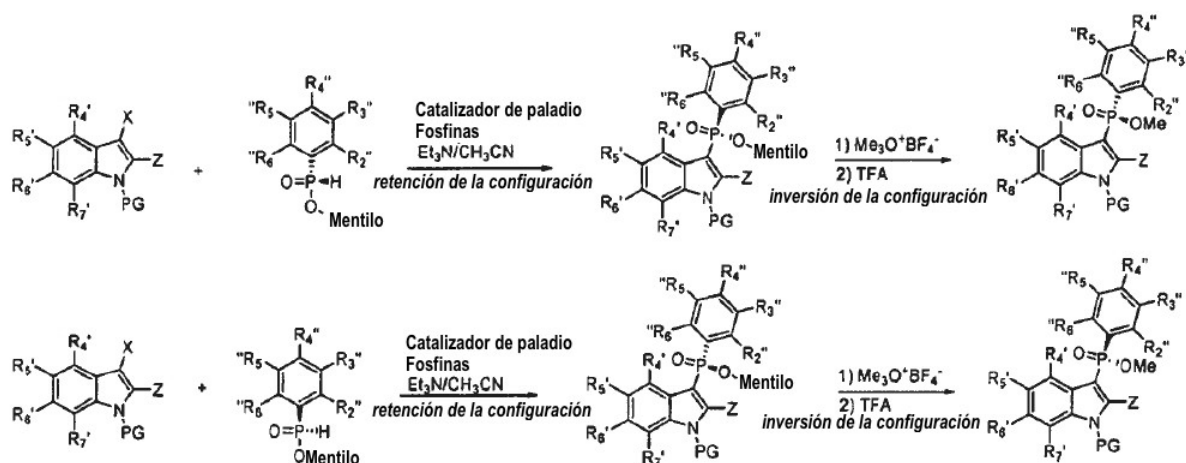
Recuperación

La recuperación global es 18% a partir del ácido racémico 6 usando bien efedrina (1R,2S) 7 o bien hemihidrato de efedrina (1S,2R) 8, pero sin ninguna optimización del procedimiento.

Ejemplo 5

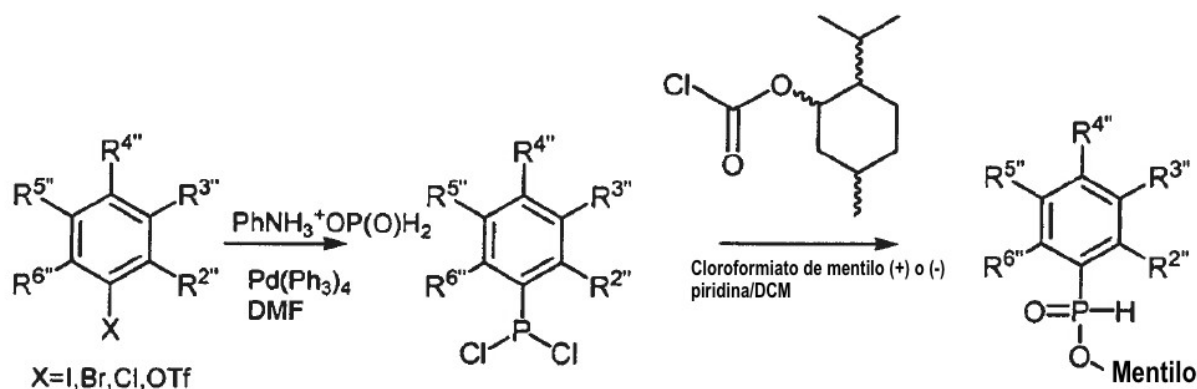
Síntesis quiral de 3-fosfoindoles

Síntesis con productos intermedios ópticamente puros, donde el centro quiral se conserva completamente o se invierte completamente. En este caso, la base usada para el acoplamiento cruzado (p. ej. Et₃N) no es suficientemente fuerte para permitir que se produzca la racemización del fosfinato H-P de partida (al contrario que el procedimiento DKR). La reacción de acoplamiento cruzado avanza con retención de la configuración. La escisión del fosfinato de mentilo usando sal de trialquiloxonio, seguida por tratamiento ácido, avanza con inversión de la configuración (J. Org. Chem 1975, 1523-1525). Este procedimiento se representa en el Esquema 20.



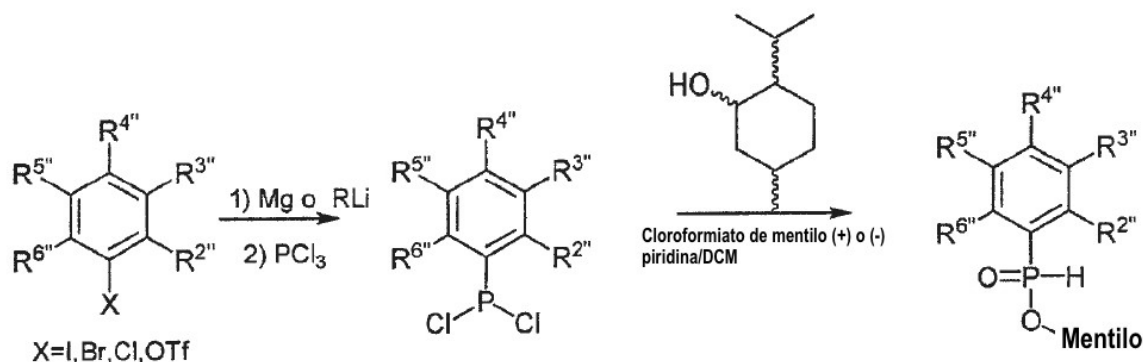
Esquema 20

La preparación del compuesto de fosfinato de mentilo se realiza en dos etapas a partir de haluros o triflatos de arilo (Esquema 21). La primera etapa es la preparación de ácido H-fosfónico según métodos descritos tales como el trabajo de Montchamp et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123:510-511 y Montchamp et al., *J. Organomet. Chem.* 2002, 643-644:154-163. La segunda etapa es una reacción de Hewitt tal como la descrita en *Tetrahedron Lett.* 2003, 781-783.



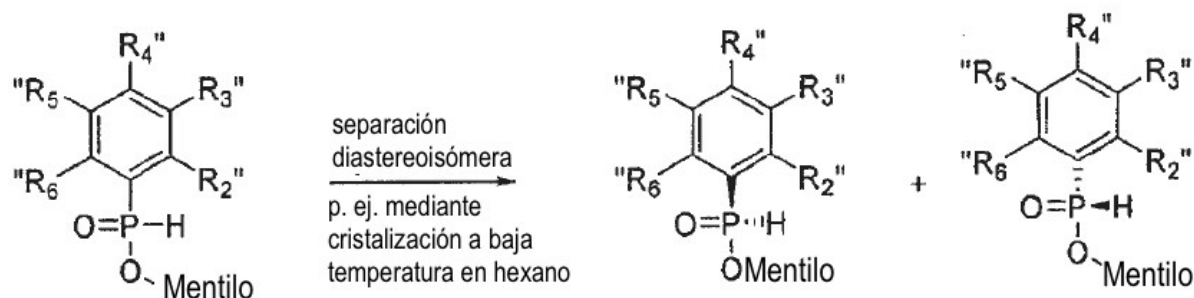
Esquema 21

- 10 Un segundo enfoque para sintetizar fosfinato de mentilo también empieza a partir de un haluro de arilo para producir diclorofosfito con un método disponible en la bibliografía (Esquema 22). A continuación, el ataque de mentol (-) o (+) da fosfinato de mentilo como una mezcla diastereoisómera según se describe en *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 90, 3459-3465.



Esquema 22

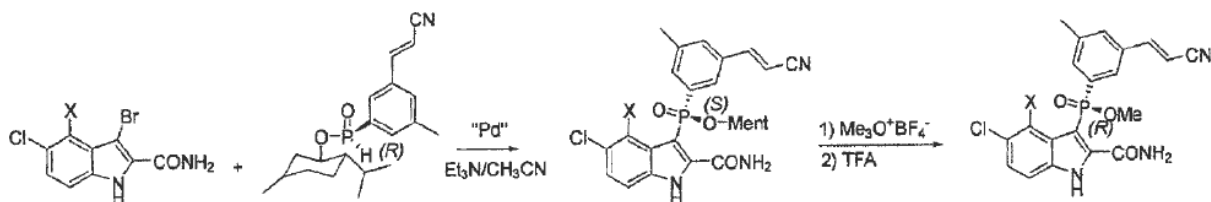
La separación de los diastereoisómeros se realiza mediante cristalización usando o adaptando las condiciones descritas en *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 5809-5810, *Heteroatom Chemistry* 1995, 6, 365-70, *Russ. J. Gen. Chem.* 2005, 75, 656-657 (Esquema 23).



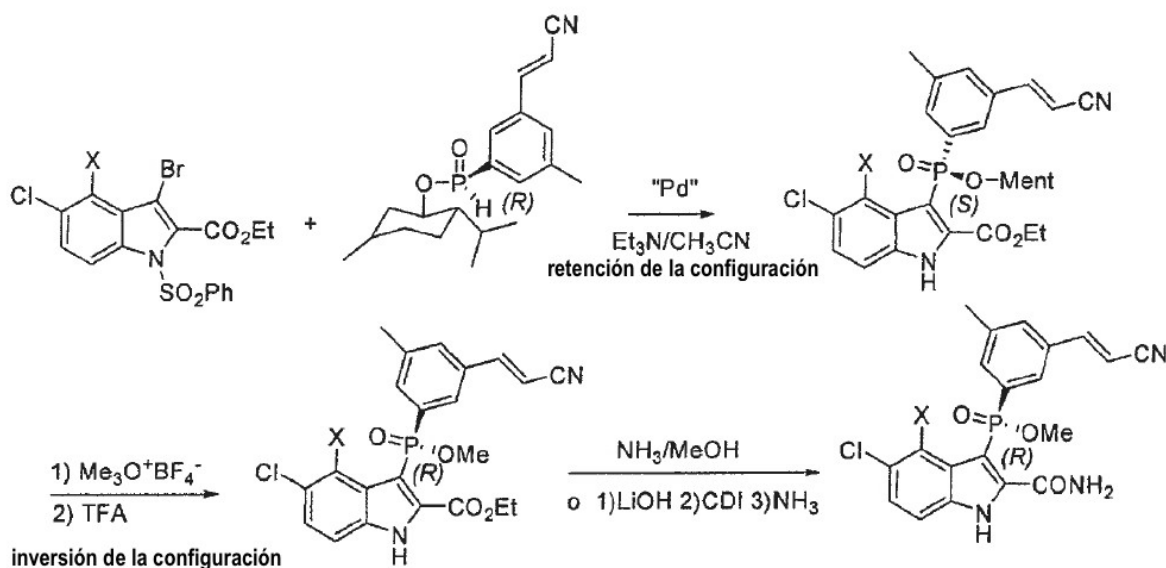
5

Esquema 23

Los Esquemas 24 y 25 representan la síntesis quiral de 3-fosfoindoles de Fórmula I y III usando este enfoque:



Esquema 24



10

Esquema 25

Para la separación analítica de enantiómeros, las condiciones para el análisis por HPLC quiral son:

Columna: DAICEL CHIRALPAK® AD-H 5 μ m, 250x4,6 mm D.I.

Fase Móvil A: Metanol

Fase Móvil B: IPA+TFA al 0,05% en peso

15 Mezcla Isocrática: A/B (25/75)

Caudal: 0,4 ml/min

Detección: Gráfica máx. PDA 210-400 nm

TR Enantiómero 1 = 13,4 min.; TR Enantiómero 2 = 19,6 min.

Método preparativo:

Inyección de 2 g de mezcla racémica (IM403):

Columna: DAICEL CHIRALPAK® AD 20 μ m, 260x50 mm D.I.

Fase Móvil: 50 etanol/50 metanol/ 0,1 dietilamina (v/v/v)

5 Caudal: 120 ml/min

Detección: UV 320 nm

TR Enantiómero 1 = 7,0 min; TR Enantiómero 2 = 25,3 min.

Otro enfoque para la síntesis de 3-fosfoindoles enantiómeramente puros se representa en los esquemas 49 y 50.

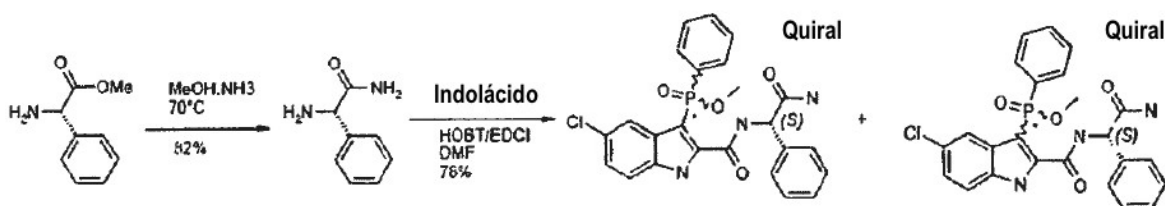
10 completo o si se observa una mezcla de diastereoisómeros. La etapa más sensible podría ser la desprotección de borano que requería calor. Desde este paso, la medida del exceso enantiómero requiere el uso de una columna de HPLC analítica quiral.

Si la configuración en el fósforo está controlada al 100% en cada etapa, el precursor simple 4 puede conducir a los dos enantiómeros diferentes 8 o 12 dependiendo de la ruta química seleccionada.

Ejemplo 6

15 Resolución de productos intermedios diastereoisómeros

Un método adicional para la preparación de 3-fosfoindoles enantiómeramente puros confía en la preparación de diastereoisómeros mediante la funcionalización de los indoles con reactivos quirales. El uso de aminoácidos quirales para preparar 3-fosfoindoles diastereoisómeros se representa en el Esquema 26. La quiralidad S en el carbono de aminoácido α está inalterada. La síntesis se efectúa como sigue:

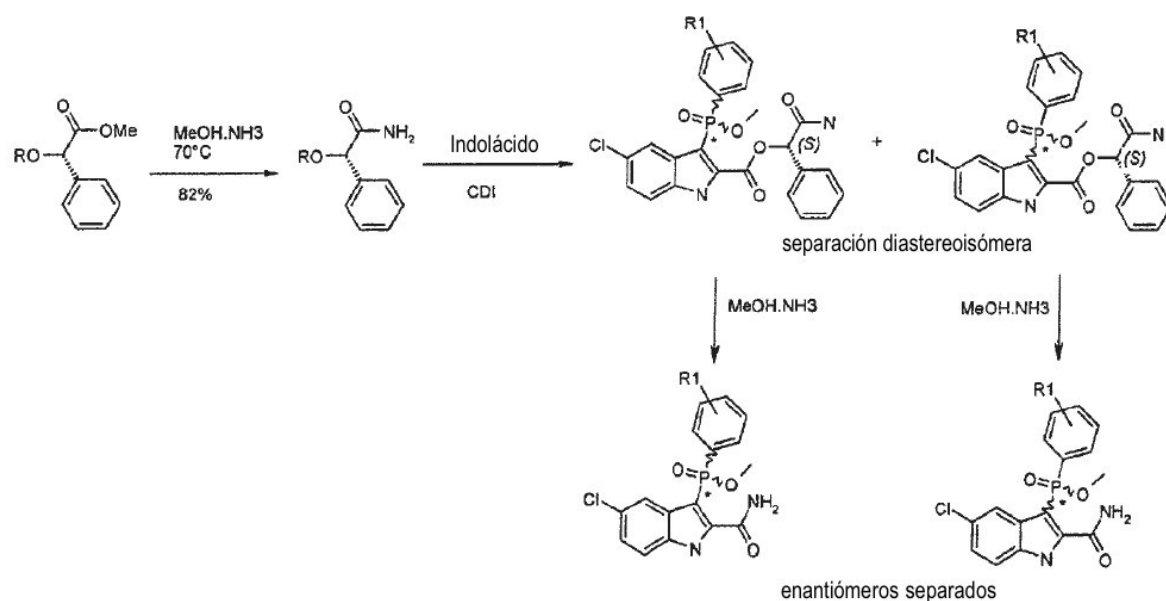


20

Esquema 26

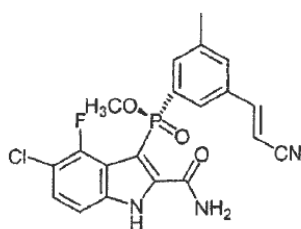
Los 2 diastereoisómeros se separan usando una columna de sílice estándar.

25 Esta estrategia se puede aplicar para preparar otras amidas diastereoisómeras con bencilaminas enantiómeramente puras, por ejemplo, o para preparar ésteres diastereoisómeros en vez de amidas que se podrían escindir después de la separación diastereoisómera para liberar el enantiómero separado. Este enfoque se muestra en el Esquema 27 posteriormente.

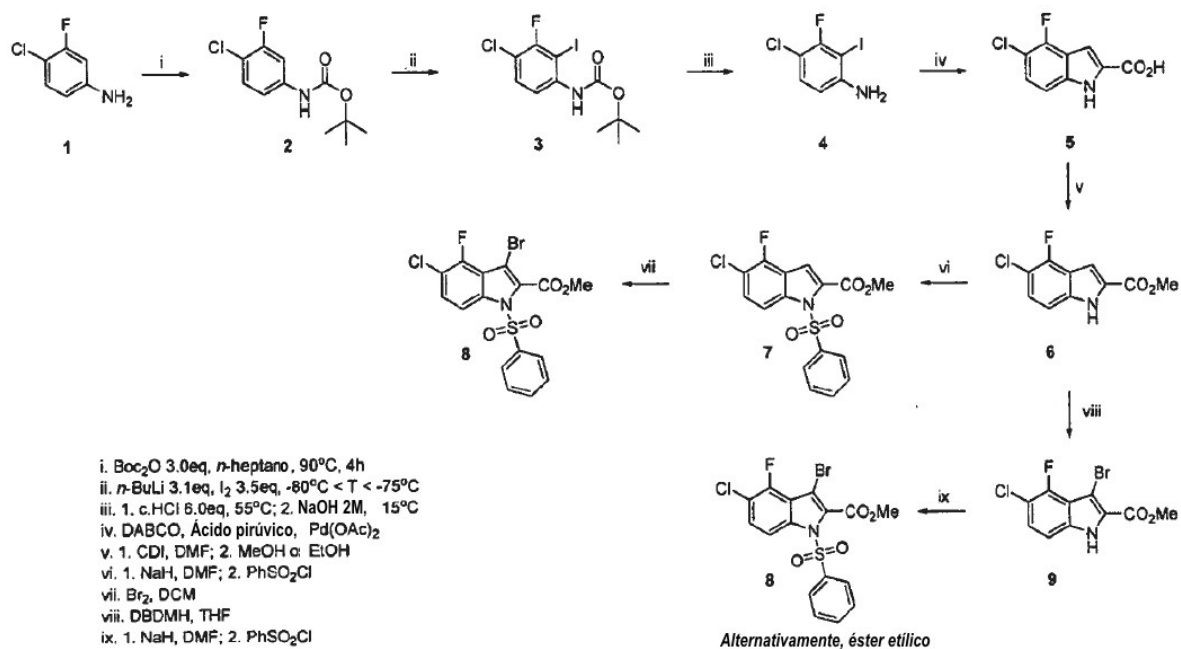


Esquema 27

Ejemplo 7

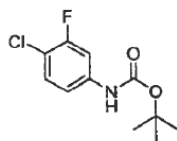


5 Preparación del Compuesto I (Referencia)



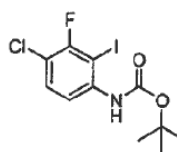
Parte A: Síntesis del producto intermedio 3-bromoindólico

Compuesto 102



- Se añadió 4-cloro-3-fluoroanilina (250,3 g, 1,719 mol) a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 l equipado con agitador superior, condensador de reflujo, manta calefactora, controlador de la temperatura, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargaron al matraz n-heptano (2.000 ml) y dicarbonato de di-t- butilo (450,3 g, 2,064 mol). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura normal durante 15 min. permitiendo la disolución de la mayoría de los sólidos. La mezcla se calentó hasta reflujo durante 4 h bajo argón (precaución: generación de CO₂ g). El análisis de la mezcla de reacción mediante el método de HPLC Prueba 20 (THF:MeCN 1:1) indicaba la conversión completa de la materia prima (Tr 4,57 min.) en un producto (Tr 6,17 min.).
- Se dejó que la reacción se enfriara hasta 50-55°C y se transfirió en dos porciones a un matraz de fondo redondo de una boca de 3 l. Se retiró un total de 1.500 ml de destilado mediante concentración a vacío a 45°C para dar una solución de color melocotón con cristales blancos. Se dejó que la suspensión se enfriara hasta temperatura normal, mientras se agitaba, durante 1,5 h. El matraz se almacenó a 4°C durante 15 h, tiempo después del cual los cristales se filtraban bajo vacío y se lavaban con n-heptano frío (400 ml).
- Después de secar a 35°C bajo vacío durante 7 h, se obtuvieron cristales blancos muy finos del Compuesto 102 (393.1 g, 93% de rendimiento). Compuesto 102: C₁₁H₁₃ClFNO₂ 245,68 g/mol⁻¹. Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 6,16 min; 99% de pureza a 254 nm. p. f.: 103-104°C. ¹H NMR δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1,51 (9H, s, 3 x CH₃), 6,56 (1H, s an, N-H), 6,94, 7,25, 7,35 (3 x 1H, 3 x m, 3 x Ar-H).

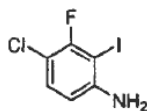
Compuesto 103



- El Compuesto 102 (80,2 g, 0,326 mol) se añadió a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 3 l equipado con un agitador superior, una sonda para la temperatura interna, un embudo de adición de 500 ml y una entrada de argón. Se cargó al matraz tetrahidrofurano anhidro (640 ml) y se enfrió usando un baño de hielo seco más nitrógeno líquido, asegurando una temperatura interna de -80°C < T < -75°C en todos los momentos durante la reacción. Se transfirió n-butil-litio (405 ml, 1,011 mol) a través de una cánula al embudo lleno de argón y se añadió gota a gota a la solución son salpicaduras mínimas a lo largo de 2 h. Después de dejar envejecer durante 40 min, una solución de yodo (289,9 g, 1,142 mol) en tetrahidrofurano anhidro (430 ml + 100 ml de enjuague) se añadió gota a gota a la mezcla de reacción fría, asegurando una temperatura interna de -80°C < T < -75°C a lo largo de 3 h. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara lentamente hasta -30°C a lo largo de 14 h, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (muestra extinguida con NaHSO₃ ac., diluida con MeCN y a continuación capa de MeCN diluida con MeOH) indicaba la conversión casi completa de la materia prima (Tr 6,17 min., 1,6% a 254 nm) en un producto (Tr 6,73 min.).
- Se añadió gradualmente una solución de NH₄Cl (41,6 g en 160 ml de agua), seguido por una solución de NaHSO₃ (184,8 g en 560 ml de agua) asegurando T < -10°C. Se dejó que la mezcla de extinción se calentara hasta 10°C mientras se agitaba durante 1,5 h.
- Después de transferir la mezcla un matraz de una boca, se retiraron 1.370 ml de destilado de THF y se añadió agua (500 ml). La mezcla se agitó vigorosamente a 4°C durante 15 h y se filtró. Después de lavar con agua (400 ml) se obtuvo un sólido beige con un filtrado incoloro que no contenía producto por HPLC.
- El sólido se disolvió en etanol caliente (65°C) (700 ml) y se filtró mientras estaba caliente para retirar el material insoluble (3,5 g, sin producto por HPLC). El filtrado obtenido se concentró a 45°C bajo vacío hasta 150 ml, punto en el cual los sólidos empezaban a precipitar. Se añadió agua (32 ml) gota a gota a la mezcla que a continuación se enfrió lentamente hasta 4°C a lo largo de 1,5 h. La filtración bajo vacío, el lavado con etanol:agua 2:1 (250 ml) a 4°C y el secado bajo vacío a 40°C daban el Compuesto 103 como un sólido amarillo claro (114,1 g, 94% de rendimiento). Compuesto 103: C₁₁H₁₂ClFINO₂ 371,57 g/mol⁻¹. Análisis por HPLC (Prueba 20, MeOH): Tr 6,73 min; 99% de pureza a 272 nm. p. f.: 66-67°C. ¹H NMR δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1,45 (9H, s, 3 x CH₃), 7,27 (1H, dd, Ar-H), 7,55 (1H, t, Ar-H), 8,70 (1H, s, CON-H). ¹³C NMR δ_C (100 MHz, CDCl₃): 28,04 (C(CH₃)₃), 79,73 (C(CH₃)₃), 86,23, 86,49 (C-I), 115,11,

115,32 (C-Cl), 122,35, 122,38 (C-N), 129,89 (C-H), 140,99, 141,02 (C-H), 152,94 (C=O), 155,47, 157,87 (C-F).

Compuesto 104



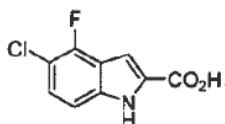
Se añadió el Compuesto 103 (110,0 g, 0,296 mol) a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 3 l equipado con un agitador superior, un condensador de reflujo, un baño de agua, un embudo de adición de 250 ml, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargó etanol (900 ml) al matraz y se enfrió hasta 5°C. Se añadió ácido clorhídrico (37%, 145,9 ml) gota a gota manteniendo la temperatura interna por debajo de 15°C.

La mezcla se calentó hasta 50-55°C durante 2 h, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeOH) indicaba una conversión completa de la materia prima (Tr 6,73 min.) en un producto (Tr 5,44 min.). La reacción se enfrió hasta 5°C y se añadió gradualmente una solución de NaOH (80,0 g en 1.000 ml de agua preparados, 865 ml añadidos) manteniendo la temperatura por debajo de 15°C, verificando el pH hasta la neutralidad. La mezcla se transfirió a un matraz de una boca y se almacenó a 4°C durante 15 h.

Se retiró un total de 970 ml de destilado mediante concentración a vacío a 35°C para dar una solución incolora con sólidos precipitados. Se dejó que la suspensión se enfriara hasta 4°C durante 1 h, tiempo después del cual el sólido se filtró bajo vacío y se lavó con etanol:agua 1:4 (200 ml) a 4°C. Después de secar a 35°C bajo vacío durante 72 h, se obtuvo Compuesto 104 impuro (80 g, 99% de rendimiento, 95% de pureza a 254 nm).

El sólido se disolvió en etanol caliente (60°C) (450 ml) y se filtró mientras estaba caliente para retirar el material insoluble fino. El filtrado obtenido se concentró a 35°C bajo vacío hasta 175 ml, punto en el cual se añadía agua (70 ml) gota a gota a la mezcla a lo largo de 3-4 h, que a continuación se enfrió hasta 4°C y se agitó durante 0,5 h más. La filtración bajo vacío, el lavado con etanol:agua 3:2 (100 ml) a 4°C y el secado bajo vacío a 35°C daban el Compuesto 104 como agujas naranjas (70,5 g, 88% de rendimiento, 98% de pureza a 272 nm). Se obtuvo una segunda fracción de material de las aguas madres como un sólido amarillo claro (4,6 g, 5%, 98% de pureza a 272 nm). Rendimiento combinado = 93%. Compuesto 104: C₆H₄ClFIN 271,45 g/mol⁻¹. Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 5,44 min.; 98% de pureza a 272 nm. p. f.: 80,5-81°C. ESI +vo: m/z 271,9 [M+H]⁺ 65%; 312,9 [M+MeCN+H]⁺ 100%. ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 5,69 (2H, s, 2 x N-H), 6,55 (1H, d, Ar-H), 7,18 (1H, t, Ar-H). ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 70,97, 71,24 (C-I), 104,03, 104,25 (C-Cl), 110,14, 110,17 (C-H), 129,90 (C-H), 150,09, 150,14 (C-N), 155,45, 157,82 (C-F). ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d₆-DMSO): -91,60 (1F, d)

Compuesto 105

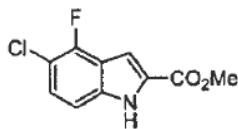


El Compuesto 104 (74,5 g, 0,275 mol) se añadió a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 2 l equipado con un agitador superior, un condensador de reflujo, una manta calefactora, un controlador de la temperatura, un embudo de adición de 250 ml, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargó al matraz N,N'-dimetilformamida (575 ml) a temperatura normal. Se añadió DABCO (95,5 g, 0,851 mol) en una porción y la temperatura interna cayó hasta 15°C. La mezcla se agitó durante 20 min. para efectuar la disolución y la solución se desgasificó burbujando argón a su través vigorosamente durante 10 min. Se añadió ácido pirúvico (57,33 ml, 0,824 mol) a la solución parda a lo largo de 10 min. y la temperatura interna ascendió hasta 36°C. La solución se desgasificó de nuevo con argón durante 10 min. y se añadió acetato de paladio (678 mg, 0,0030 mol) en una porción.

La mezcla se calentó hasta 100°C durante 3 h, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeCN, filtrado) indicaba una conversión completa de la materia prima (Tr 5,44 min.) en un producto (Tr 3,64 min.). La reacción se enfrió hasta temperatura normal durante 15 h y posteriormente hasta 5°C. Se añadió gradualmente una solución de ácido clorhídrico (1,15 N, 575 ml y a continuación 0,115 N, 280 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 10°C, verificando el "pH" hasta pH = 3,5. Un sólido color canela precipitaba en la solución y la mezcla se agitó durante 0,5 h adicionales a 5°C. El sólido se filtró bajo vacío y se lavó con agua a 10°C (3 x 200 ml). Después de secar a 40°C bajo vacío durante 36 h, se obtuvo el Compuesto 105 (55,9 g, 95% de rendimiento). Compuesto 105: C₉H₅ClFNO₂ 213,59 g/mol⁻¹. Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 3,63 min.; 99% de pureza a 272 nm ESI-vo: m/z 212,1 [M-H]⁻ 10%; 168,1 [M-COOH]⁻ 100% ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 7,10, 7,11 (1H, d, Ar-H), 7,25-7,32 (2H, m, 2 x Ar-H), 12,30, 13,33 (2 x 1H, 2 x s, N-H, COO-H) ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 102,45 (C-3), 108,76, 108,92 (C-9), 110,20, 110,24 (C-6), 116,88, 117,09 (C-5), 125,46 (C-7), 130,34 (C-2), 137,90,

138,00 (C-8), 149,76, 152,25 (C-4), 162,12 (C=O) ^{19}F NMR δ_{F} (376 MHz, d_6 -DMSO): -121,35 (1F, d).

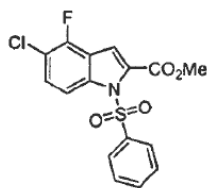
Compuesto 106



El Compuesto 105 (55,9 g, 0,262 mol) se añadió a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 l equipado con un agitador superior, un embudo de adición, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargó al matraz *N,N*-dimetilformamida (695 ml) a temperatura normal bajo argón, agitando durante 20 min. para obtener una solución marrón. Se añadió carbonildiimidazol (51,0 g, 0,314 mol) en una porción dando una suspensión parda. La mezcla se agitó durante 1 h bajo argón a temperatura normal, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeOH para dar éter Me, filtrado) indicaba la conversión incompleta de la materia prima (Tr 3,64 min., 0,5%) en un producto principal (Tr 5,48 min.) más un producto intermedio (Tr 4,77 min.). Se añadieron carbonildiimidazol (0,43 g, 0,0026 mol) y *N,N*-dimetilformamida (45 ml) adicionales y la reacción se agitó durante 2 h más, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeOH para dar éster Me, filtrado) indicaba una conversión completa de la materia prima (Tr 3,64 min.) en producto (Tr 5,48 min.). Se añadió metano (297 ml, 7,34 mol) a la mezcla de reacción agitada bajo argón a 24°C para dar una suspensión parda turbia. Después de 3 h de análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeCN, filtrado) indicaba un producto (Tr 5,48 min.). La mezcla de reacción se enfrió usando un baño de hielo y se añadió agua (2.000 ml) a lo largo de 0,5 h manteniendo la temperatura interna a 15-20°C para precipitar un sólido de color canela. El sólido se filtró bajo vacío y se lavó con agua a 5°C (2 x 400 ml). Después de secar al aire, el sólido se recogió en diclorometano (800 ml) y acetato de etilo (1.600 ml) y se secó con sulfato sódico anhidro (400 g). La filtración a través de Celite y la elución con diclorometano (1.000 ml) daban una solución naranja transparente. La solución se concentró bajo vacío a 30°C dejando una suspensión de cristales en el acetato de etilo restante (160 ml). La suspensión se enfrió hasta 5°C con un baño de hielo durante 15 min. La filtración bajo vacío, el lavado con acetato de etilo:n-heptano 1:1 (2 x 100 ml) y a continuación 1:3 (100 ml) a 4°C y el secado bajo vacío a 35°C daban el Compuesto 6 como agujas blancas largas (37,3 g, 63% de rendimiento, 99% de pureza a 272 nm). Se obtuvo una segunda fracción de material de las aguas madres como agujas menos blancas (5,3 g, 9%, 98% de pureza a 272 nm). Rendimiento combinado = 72%. Compuesto 106: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClFNO}_2$ 227,62 g mol^{-1} Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 5,48 min.; 99% de pureza a 272 nm

p. f.: 216,5-218°C ^1H NMR δ_{H} (400 MHz, d_6 -DMSO): 3,88 (3H, s, CH_3), 7,16 (1H, s, Ar-H), 7,27-7,35 (2H, m, 2 x Ar-H), 12,48 (1H, s, N-H) ^{13}C NMR δ_{C} (100 MHz, d_6 -DMSO): 52,15 (CO_2CH_3), 102,90 (C-3), 108,97, 109,12 (C-9), 110,27, 110,31 (C-6), 116,77, 116,98 (C-5), 125,84 (C-7), 128,82 (C-2), 138,00, 138,09 (C-8), 149,77, 152,26 (C-4), 161,05 (C=O) ^{19}F NMR δ_{F} (376 MHz, d_6 -DMSO): -121,11 (1F, d)

Compuesto 107

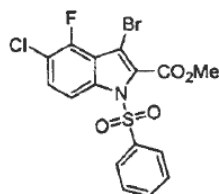


El Compuesto 106 (46,5 g, 0,204 mol) se añadió a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 2 l equipado con un agitador superior, un baño de hielo, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargó al matraz *N,N*-dimetilformamida anhidra (450 ml) a temperatura normal bajo argón, agitando para obtener una solución naranja. Se añadió hidruro sódico (95%, 7,30 g, 0,290 mol) en porciones a lo largo de 45 min. manteniendo la temperatura interna por debajo de 5°C. No se observaba desprendimiento de gas adicional. Se añadió gota a gota cloruro de fenilsulfonilo (35,8 ml, 0,280 mol) a lo largo de 15 min. manteniendo la temperatura interna por debajo de 10°C. La reacción se agitó durante 1 h, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (MeCN) indicaba la conversión incompleta de la materia prima (Tr 5,48 min., 4% a 272 nm) en producto (Tr 6,42 min.). Se añadieron porciones adicionales de hidruro sódico (95%, 1,1 g) y cloruro de fenilsulfonilo (4,0 ml) y la mezcla se agitó durante a 1,5 h más. El análisis por el método de HPLC Prueba 20 (MeCN) indicaba la conversión incompleta de la materia prima (Tr 5,48 min., 3% a 272 nm) en producto (Tr 6,43 min.). La reacción se trató mediante la adición lenta de agua (770 ml) a lo largo de 25 min., asegurando que la temperatura interna se mantuviera por debajo de 20°C, permitiendo que precipitara un sólido amarillo. El sólido se filtró bajo vacío, se lavó con agua a 5°C (770 ml) y se secó a 37°C durante 15 h. El sólido se recogió en etanol (700 ml) y se calentó hasta

55°C con agitación durante 1 h. La suspensión caliente se concentró bajo vacío a 40°C retirando 350 ml de destilado, dejando enfriar a continuación hasta 5°C durante 0,5 h. La filtración bajo vacío, el lavado con etanol a 4°C (150 ml) y el secado bajo vacío a 40°C daban el Compuesto 107 como un sólido amarillo claro (68,5 g, 91% de rendimiento). Compuesto 107: C₁₆H₁₁ClFNO₄S 367,78 g mol⁻¹ Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 6,43 min.; 98% de pureza a 272 nm p. f.: 163°C expandido, 166-167°C fundido

¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 3,88 (3H, s, CH₃), 7,51 (1H, s, Ar-H), 7,62-7,68 (3H, m, 3 x Ar-H), 7,77 (1H, t, Ar-H), 7,92 (1H, d, Ar-H), 8,04 (2H, d, Ar-H) ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 53,21 (CO₂CH₃), 110,60 (C-3), 112,30, 112,34 (C-6), 114,02, 114,17 (C-9), 117,93, 118,14 (C-5), 127,14 (2 x Ar-C), 128,78 (C-7), 129,85 (2 x Ar-C), 132,29 (C-2), 135,24 (C-para), 136,82 (C-ipso), 136,88, 136,96 (C-8), 149,37, 151,89 (C-4), 160,51 (C=O) ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d₆-DMSO): -119,42 (1F, d)

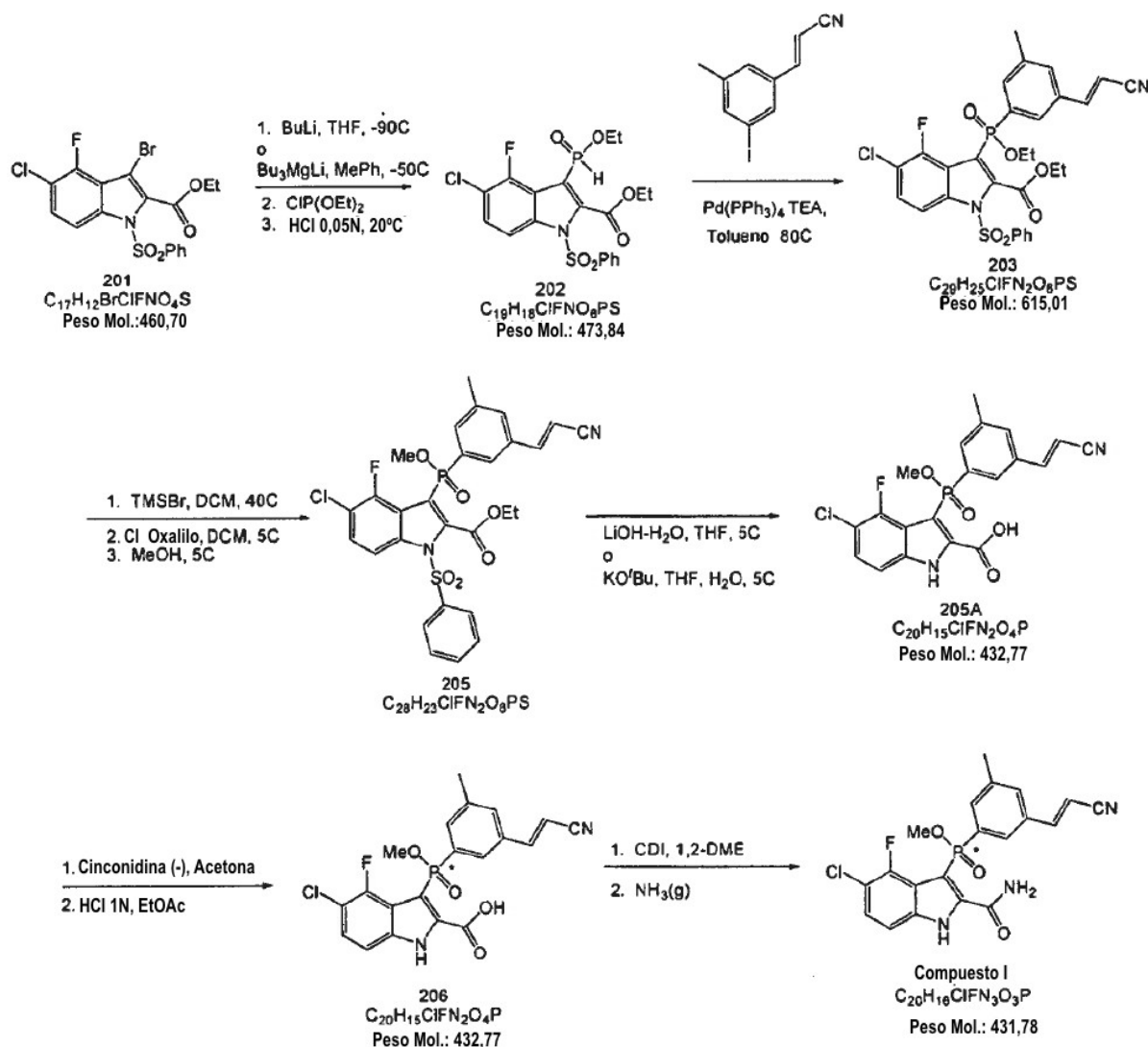
Compuesto 108



El Compuesto 107 (68,4 g, 0,186 mol) se añadió a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 2 l equipado con un agitador superior, un embudo de adición, un baño de hielo, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se cargó al matraz diclorometano anhidro (685 ml) a temperatura normal bajo argón, agitando para obtener una suspensión parcial. Se añadió bromo (11,5 ml, 0,223 mol) gota a gota a lo largo de 20 min. manteniendo la temperatura interna por debajo de 10°C dando una mezcla de color rojo oscuro. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura normal durante 1 h, tiempo después del cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (muestra extinguida con NaHSO₃ ac., diluida con MeOH y a continuación el MeOH filtrado y diluido con MeCN) indicaba la conversión incompleta de la materia prima (Tr 6,43 min., 78% a 272 nm) en un producto secundario (Tr 6,76 min.). Se añadió en porciones bromo adicional (12,4 ml) a lo largo del transcurso de las 6 h siguientes y se dejó que la reacción se agitara a temperatura normal durante 14 h, punto en el cual el análisis mediante el método de HPLC Prueba 20 (muestra extinguida con NaHSO₃ ac., diluida con MeOH y a continuación el MeOH filtrado y diluido con MeCN) indicaba una conversión completa de la materia prima (Tr 6,43 min.) en un producto principal (Tr 6,76 min.). La reacción se extinguió mediante la adición de una solución de NaHSO₃ (132 g en 400 ml de agua) que aseguraba T < 15°C gota a gota a lo largo de 30 min. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado (400 ml x 2). Las capas acuosas se extrajeron con diclorometano (400 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1.000 ml), y se secaron con sulfato sódico anhidro (500 g). La filtración y la concentración bajo vacío a 28°C daban un sólido amarillo bruto (78 g). El sólido se trituró en etanol caliente (650 ml) a 50°C durante 1 h. La suspensión caliente se concentró bajo vacío a 40°C retirando 450 ml de destilado, y a continuación dejando enfriar hasta 5°C durante 0,5 h. La filtración bajo vacío, el lavado con etanol a 4°C (150 ml) y el secado bajo vacío a 25°C daban el Compuesto 108 como un polvo amarillo claro (72,6 g, 88% de rendimiento, 93% de pureza a 272 nm). Este sólido se disolvió en acetato de etilo caliente (500 ml) a 50°C durante 1 h, se añadió lentamente etanol (200 ml) a 50°C y se agitó durante 15 min. Comenzó la precipitación y la suspensión caliente se concentró bajo vacío a 40°C retirando 475 ml de destilado, a continuación se dejó enfriar hasta 5°C durante 0,5 h. La filtración bajo vacío, el lavado con etanol a 4°C (150 ml) y el secado bajo vacío a 25°C daban el Compuesto 108, 3-bromo-5-cloro-4-fluoro-1-bencenosulfonil-indol-2-carboxilato de metilo, como un polvo amarillo claro (57,4 g, 69% de rendimiento, 97% de pureza a 272 nm). Se obtuvo una segunda fracción de material a partir de las aguas madres como un sólido amarillo (9,6 g, 12%). Rendimiento combinado = 81%. 3-Bromo-5-cloro-4-fluoro-1-bencenosulfonil-indol-2-carboxilato de metilo Compuesto 108: C₁₆H₁₀BrClFNO₄S 446,68 g mol⁻¹ Análisis por HPLC (Prueba 20, MeCN): Tr 6,76 min.; 97% de pureza a 272 nm ESI+vo: m/z 447,8 [M+H]⁺ 90%; 464,8 [M+NH₄]⁺ 100%

ESI-vo: m/z 445,9 [M-H]⁻ 100% ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 3,99 (3H, s, CH₃), 7,66 (3H, t, 3 x Ar-H), 7,78 (1H, t, Ar-H), 7,90 (1H, d, Ar-H), 7,98 (2H, d, 2 x Ar-H) ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 53,88 (CO₂CH₃), 96,66 (C-3), 111,87, 111,90 (C-6), 115,36, 115,51 (C-9), 117,29, 117,45 (C-5), 127,16 (2 x Ar-C), 129,40 (C-7), 130,15 (2 x Ar-C), 130,45 (C-2), 134,63, 134,69 (C-8), 135,46 (C-para), 135,81 (C-ipso), 149,31, 151,85 (C-4), 160,30 (C=O) ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d₆-DMSO): -124,00 (1F, d)

Parte B: Síntesis del Compuesto I



Compuesto 202

- 5 A un reactor adecuado se cargaron el Compuesto 201 (57 g, 0,12 mol) y tetrahidrofurano (570 ml). La solución resultante se refrigeró hasta de -90° a -100°C bajo nitrógeno usando un baño viscoso de LN₂/IPA y a continuación se trató con n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 52 ml, 0,13 mol) añadido a lo largo de 10 minutos. Se añadió a esto clorofosfito de dietilo (20,5 g, 0,13 mol) a lo largo de 10 minutos. La HPLC (Método 001, TR = 17,7 min.) no mostraba materia prima y mostraba alrededor de 70% de producto. A continuación, la reacción se diluyó con acetato de etilo (570 ml) y se dejó que se calentara hasta -40°C. A continuación, la mezcla se trató con (0,5 M, 400 ml) y se dejó que se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Las capas resultantes se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (500 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron hasta un aceite. AUC por HPLC 78% (Método 20, TR = 5,6 min.) > 100% de rendimiento debido a las impurezas y el disolvente. Usado según está en la siguiente etapa. Datos para el éster metílico C-2: n° 2x: $C_{18}H_{16}ClFNO_6PS$ 459,81 g/mol⁻¹ m/z (ESI⁺): 460,0 (MH⁺, 100%), 462,0 (MH⁺, 35%).

Compuesto 203

- 20 Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 202 (56 g, 0,10 mol estimados), yodocinamonitrilo (27 g, 0,10 mol), trietilamina (17 ml, 0,12 mol) y tolueno (475 ml). La mezcla resultante se desgasificó rociando una corriente de nitrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente, tiempo después del cual se añadía tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (6,0 g, 0,005 mol). La mezcla se roció durante 5 minutos adicionales y a continuación se calentó hasta 80°C durante 2 horas. La HPLC (Método 20, TR = 6,2 min.) mostraba una reacción completa. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de celita y se lavó con acetato de etilo (1.000 ml.). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 500 ml) y a continuación se secaron

sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron hasta un volumen de 170 ml. El concentrado se enfrió hasta 0°C y se agitó a lo largo de 1 hora, tiempo durante el cual el producto cristalizaba. Los sólidos se filtraron y se lavaron con hexano:tolueno (2:1, 150 ml). Se secaron para dejar 54 g, AUC HPLC 85% (Método 20.)

5 A continuación, el sólido bruto se purificó mediante cromatografía en columna eluido con acetato de etilo al 25% en cloruro de metileno. Las fracciones puras se recogieron y se combinaron para dar los Compuestos 203, 41 g, 67% de rendimiento, AUC HPLC 96% (método Prueba 20, TR = 6,2 min.).

10 Datos para el éster etílico C-2: n° 3: C₂₉H₂₅ClFN₂O₆PS 615,01 g/mol⁻¹ ¹H NMR δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1,35 (3H, t, PO₂CH₂CH₃), 1,52 (3H, t, CO₂CH₂CH₃), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 4,08-4,20 (2H, m, PO₂CH₂CH₃), 4,61 (2H, q, CO₂CH₂CH₃), 5,90 (1H, d, CH=CHCN), 7,33-7,37 (3H, m, 2 x Ar-H, CH=CHCN), 7,55 (2H, a-t, 2 x Ar-H), 7,67 (1H, a-t, Ar-H), 7,74-7,79 (3R, m, 3 x Ar-H), 8,13 (2H, d, 2 x Ar-H)

15 Datos para el éster metílico C-2: n° 3x: C₂₈H₂₃ClFN₂O₆PS 600,98 g/mol⁻¹ m/z (ESI⁺): 601,1 (MH⁺, 100%), 603,0 (MH⁺, 35%) ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 1,18 (3H, t, CH₃CH₂OP), 2,34 (3H, s, Ar-CH₃), 4,02 (5H, m, CH₃CH₂OP, CO₂CH₃), 6,47 (1H, d, CH=CHCN), 7,54 (1H, d, Ar-H), 7,62 (1H, t, Ar-H), 7,72 (1H, d, CH=CHCN), 7,70-7,76 (4H, m, 4 x Ar-H), 7,82 (1H, t, Ar-H), 7,91 (1H, d, Ar-H), 8,13 (2H, d, 2 x Ar-H). Múltiples valores de δ_C indican división de la señal de carbono debida a F y/o P. ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 15,97, 16,03 (CH₃CH₂OP), 20,79 (Ar-CH₃), 53,88 (CO₂CH₃), 61,73, 61,79 (CH₃CH₂OP), 98,39 (CH=CHCN), 107,50, 107,54 (C), 108,95, 108,99 (C), 111,37, 111,42 (C), 115,47, 115,63 (C), 116,82, 116,91, 117,01, 117,10 (C), 118,43 (CN), 127,44 (SO₂Ph, 2 x C_{orto}), 127,91, 128,02 (C-H), 128,67 (C-H), 130,27 (SO₂Ph, 2 x C_{meta}), 131,21, 131,41 (C-H), 132,68 (C), 133,29, 133,40 (C-H), 134,12, 134,27 (C), 134,55, 134,63, 134,72 (C), 135,49 (SO₂Ph, C_{ipso}), 136,09 (SO₂Ph, C_{para}), 139,10, 139,25 (C), 20 149,06, 151,60 (C-4), 149,51 (CH=CHCN), 161,10 (C=O). ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d₆-DMSO): -112,36 (1F, d). ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d₆-DMSO): 23,49 (1P, s)

Compuesto 204

25 Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 203 (41 g, 0,067 mol) y cloruro de metileno (175 ml). La solución resultante se enfrió hasta 0°C, y se trató con bromotrimetilsilano (46 g, 0,30 mol) añadido a lo largo de 15 minutos. A continuación, la reacción se calentó hasta 40°C durante 1,5 horas. La HPLC (Método 20, TR = 4,3 min.) indicaba una reacción completa. El TMSBr en exceso se separó por arrastre bajo vacío (40-45°C) y el sólido pegajoso resultante se resuspendió en DCM (200 ml) y se refrigeró hasta 0°C. Se añadió cloruro de oxalilo (12 ml, 0,13 mol) a lo largo de 15 minutos, seguido por N,N-dimetilformamida (1,0 ml), ambos añadidos a 0°C. Se observaba desprendimiento de gas durante la adición de DMF. Después de 1 hora a temperatura ambiente, la HPLC (Método 30 20, TR = 6,0 min., muestra extinguida con metanol antes de la inyección) mostraba una reacción completa. Los disolventes se separaron por arrastre de nuevo para retirar cloruro de oxalilo residual y la mezcla se resuspendió en cloruro de metileno (100 ml). La solución se refrigeró hasta 0°-5°C, y a continuación se trató con metanol (300 ml) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de dos horas, la HPLC indicaba una reacción completa (Método de HPLC 20, TR = 6,0 min.). Los disolventes se separaron por arrastre y el sólido bruto se usó como en la 35 siguiente etapa. 48 g de Compuesto 204, AUC HPLC 91%, > 100% de rendimiento debido a los disolventes y las impurezas.

40 Datos para el éster etílico C-2: 204: C₂₈H₂₃ClFN₂O₆PS 600,98 g/mol⁻¹ ¹H NMR δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1,53 (3H, t, CO₂CH₂CH₃), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 3,79 (3H, d, POCH₃), 4,61 (2H, q, CO₂CH₂CH₃), 5,90 (1H, d, CH=CHCN), 7,33-7,37 (3H, m, 2 x Ar-H, CH=CHCN), 7,55 (2H, a-t, 2 x Ar-H), 7,67 (1H, a-t, Ar-H), 7,73-7,79 (3H, m, 3 x Ar-H), 8,13 (2H, d, 2 x Ar-H)

45 Datos para el éster metílico C-2: 204x: C₂₇H₂₁ClFN₂O₆PS 586,96 g/mol⁻¹ m/z (ESI⁺): 587,1 (MH⁺, 100%), 589,0 (MH⁺, 35%) ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 2,33 (3H, s, Ar-CH₃), 3,66 (3H, d, POCH₃), 4,02 (3H, s, CO₂CH₃), 6,47 (1H, d, CH=CHCN), 7,53 (1H, d, Ar-H), 7,61 (1H, dd, Ar-H), 7,70 (1H, d, CH=CHCN), 7,68-7,76 (4H, m, 4 x Ar-H), 7,82 (1H, t, Ar-H), 7,90 (1H, d, Ar-H), 8,13 (2H, d, 2 x Ar-H). Múltiples valores de δ_C indican división de la señal de carbono debida a F y/o P. ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d₆-DMSO): 20,81 (Ar-CH₃), 52,07, 52,13 (CH₃OP), 53,99 (CO₂CH₃), 98,46 (CH=CHCN), 106,99 (C), 108,41 (C), 111,45 (C-H), 115,51, 115,67 (C), 116,77, 116,86, 117,07 (C), 118,48 (CN), 127,51 (SO₂Ph, 2 x C_{orto}), 127,92, 128,04 (C-H), 128,71 (C-H), 130,32 (SO₂Ph, 2 x C_{meta}), 131,56 (C-H), 132,20 (C), 133,35, 133,46 (C-H), 134,19, 134,34 (C), 134,55, 134,63, 134,72 (C), 135,47 (SO₂Ph, C_{ipso}), 136,16 (SO₂Ph, C_{para}), 139,20, 139,35, 139,39, 139,54 (C), 149,09, 151,63 (C-4), 149,51 (CH=CHCN), 161,15 (C=O). ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d₆-DMSO): -113,93 (1F, d). ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d₆-DMSO): 25,42 (1P, s)

Compuesto 205

55 Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 204 (48 g, alrededor de 0,072 mol) y tetrahidrofurano (800 ml). A continuación, la solución resultante se enfrió hasta 5°C y se trató con monohidrato de hidróxido de litio (12 g, 0,28 mol) y se añadió agua (180 ml) a lo largo de 15 minutos. Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente, tiempo durante el cual el color se aclaraba. Después de agitar durante la noche, la HPLC indicaba una reacción completa (Método Prueba 20, TR del producto = 4,5, TR de la impureza principal = 3,7). La reacción se enfrió hasta 5°C y se acidificó con ácido clorhídrico (5 N, 300 ml). El THF en exceso se retiró mediante evaporación bajo presión reducida y los sólidos pegajosos resultantes se suspendieron en acetona (200 ml). La mezcla se

calentó hasta 40°C durante 30 minutos, y a continuación se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se dejó que los sólidos se granularan durante 2 horas, a continuación se filtraron y se lavaron con acetona/agua (2:1, 100 ml.) Se secaron para dejar el Compuesto 205, 21 g, 67% de rendimiento. AUC HPLC 93% (método Prueba 20). Se usaron según estaban en la siguiente etapa.

5 Compuesto 206 (resolución quiral)

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 205 (432,6 g, 1,0 mol) y acetona (7,79 l). Se añadió cinconidina (-) (294,39 g, 1,0 mol) en una porción y la suspensión resultante se agitó durante cuatro horas. Los sólidos se aislaron mediante filtración y se lavaron con acetona (300 ml) para dejar 343,2 g de la sal después de secar bajo vacío, Análisis por HPLC quiral, relación = 98:2.

- 10 La sal se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (5,2 l) y HCl 1 N (5,2 l) y se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de este tiempo, las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2,7 l) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar el Compuesto 206 resuelto como un sólido blanco. 145,44 g, 68% de rendimiento global, análisis por HPLC quiral, relación = 98,4:1,6. Se usó según estaba en la siguiente etapa. N° 6: $C_{20}H_{15}ClFN_2O_4P$ 432,77 $gmol^{-1}$ m/z (ESI+): 433,0 (MH⁺, 100%), 435,0 (MH⁺, 35%)

¹H NMR δ_H (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,35 (3H, s, Ar-CH₃), 3,78 (3H, d, POCH₃), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,46 (2H, d, Ar-H), 7,66 (1H, d, CH=CHCN), 7,69, 7,81 (2H, 2 x d, H-6, H-7), 7,77 (1H, s, Ar-H), 13,63 (1H, s, N-H), 15,70 (1H, s, an, COOH). ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d_6 -DMSO): -114,27 (1F, s). ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d_6 -DMSO): 36,44 (1P, s).

Compuesto I

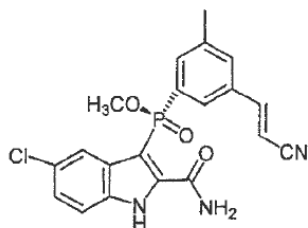
- 20 Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 206 (0,63 g, 0,0014 mol) y 1,2-dimetoxietano (10 ml). La mezcla se trató con 1,1-carbonildiimidazol (0,47 g, 0,0028 mol) añadido en una porción y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que cesaba el desprendimiento de gas (alrededor de 1,5 horas). A continuación, la solución se enfrió hasta 5°C, y se roció con amoníaco gaseoso durante 5 minutos, la HPLC (Método 20, TR del producto = 5,0 min.) mostraba una reacción completa después de una hora a temperatura ambiente. La reacción se extinguió mediante la adición de 10 g de hielo triturado y se concentró bajo presión reducida para retirar el DME. La suspensión resultante se agitó durante una hora a 5°C para granular el producto. Los sólidos se filtraron y se secaron para dejar el Compuesto I (éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-4-fluoro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico) puro. 0,56 g, 89% de rendimiento. Pureza química por HPLC (Método 20) 98,5%. Pureza quiral 97%.

- 30 Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 206 (10 g, 0,024 mol) y 1,2-dimetoxietano (150 ml). La mezcla se trató con 1,1-carbonildiimidazol (7,8 g, 0,048 mol) añadido en una porción, y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que cesaba el desprendimiento de gas. A continuación, la solución se enfrió hasta 5°C y se roció con amoníaco gaseoso durante 5 minutos. La HPLC (Método 20, TR del producto = 5,0 min.) mostraba una reacción completa después de una hora. La reacción se extinguió mediante la adición de 100 g de hielo triturado y se concentró bajo presión reducida para retirar el DME. El sólido oleoso resultante (en agua) se diluyó con metanol (20 ml) y se agitó durante una hora a 5°C para granular el producto. Los sólidos se filtraron y se secaron para dejar el Compuesto I (éster metílico de ácido (2-carbamoil-5-cloro-4-fluoro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico) puro. 9,8 g, 98% de rendimiento.

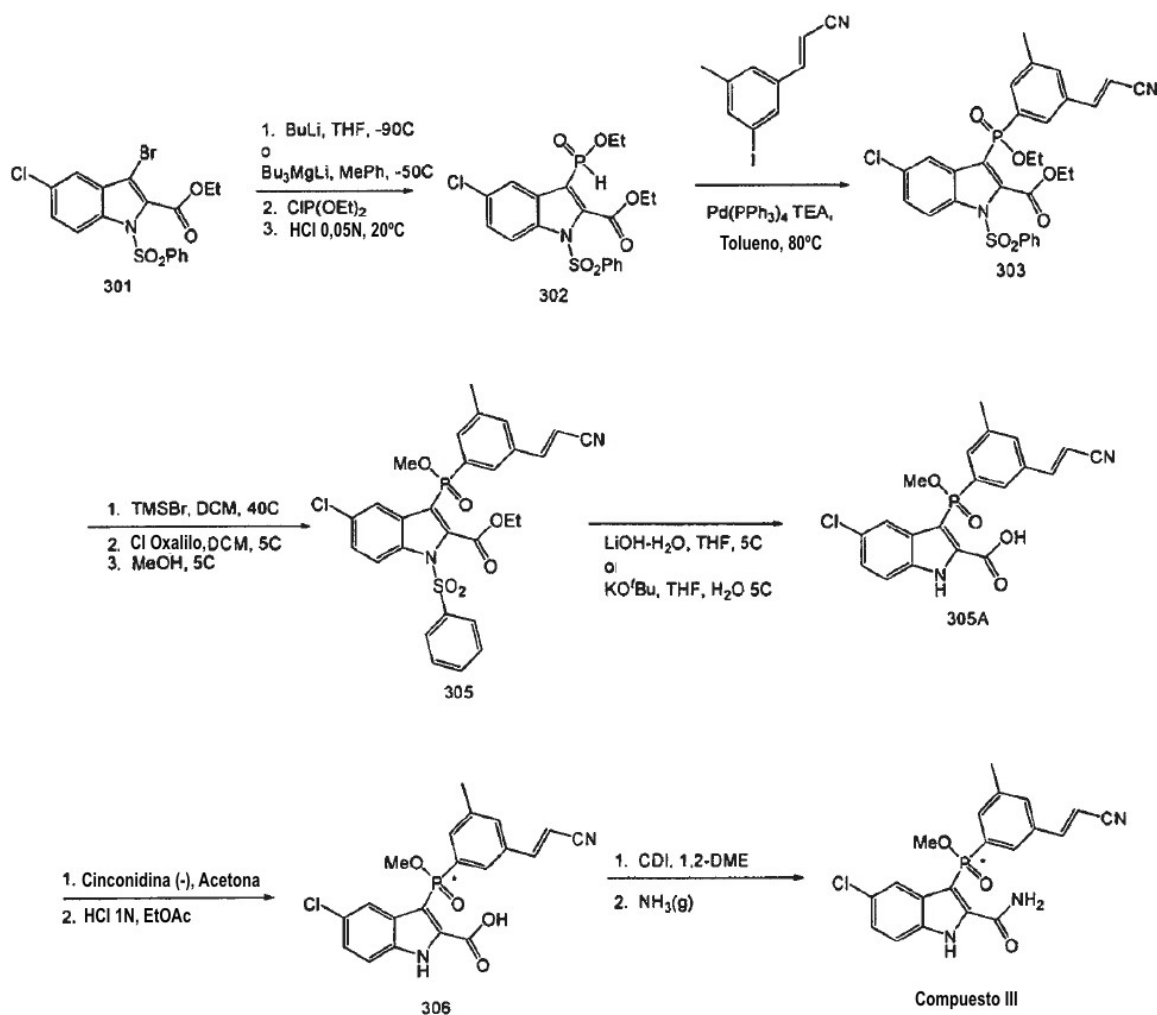
Pureza química por HPLC (Método 20) 99,5%. Pureza quiral 94,3%. Sólido blanco.

- 40 Compuesto I: $C_{20}H_{16}ClFN_3O_3P$ 431,78 $gmol^{-1}$ m/z (ESI⁺): 432,1 (MH⁺, 100%), 434,0 (MH⁺, 35%) V_{max} (disco de KBr) (cm^{-1}) 1.619,0 (amida I), 1.672,5 (amida II), 2.218,4 (CN), 3.063,0, 3.286,0 (N-H) $[\alpha]_D^{20}$: +33,42 (c, 10,04 $mgml^{-1}$ en $CHCl_3$) p. f.: 177°C brilla, 181°C se reblandece, 183-185°C se funde Análisis elemental: $C_{20}H_{17}ClN_3O_3P$ calculado C 55,63%, H 3,73%, N 9,73%, Cl 8,21%, F 4,40%, P 7,17%. Encontrado C 55,56%, H 3,74%; N 9,72%, Cl 8,24%, F 4,21 %, P 7,11 % ¹H NMR δ_H (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,32 (3H, s, Ar-CH₃), 3,70 (3H, d, CH₃OP), 6,49 (1H, d, CH=CHCN), 7,37 (1H, dd, H-6), 7,43 (1H, dd, H-7), 7,54 (1H, d, H-6'), 7,66 (1H, d, CH=CHCN), 7,69 (1H, d, H-2'), 7,73 (1H, s, H-4'), 8,05, 10,63 (2 x 1H, 2 x s, NH₂), 13,02 (1H, s, N-H) Múltiples valores de δ_C indican división de la señal de carbono debida a F y/o P. ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d_6 -DMSO): 20,77 (Ar-CH₃), 51,70, 51,76 (CH₃OP), 96,03, 96,07, 97,52, 97,56 (C-3), 98,29 (CH=CHCN), 110,70 (C-7), 111,66, 111,83 (C-5), 118,04, 118,13, 118,22, 118,32 (C-9), 118,56 (CN), 125,84 (C-6), 127,11, 127,22 (C-2'), 131,05 (C-4'), 132,57, 132,67 (C-6'), 132,96, 134,50 (C-1'), 134,03, 134,18 (C-3'), 136,40, 136,51, 136,61 (C-8), 138,95, 139,10 (C-5'), 141,71, 141,91 (C-2), 149,19, 151,70 (C-4), 149,65 (CH=CHCN), 160,46 (C=O). ¹⁹F NMR δ_F (376 MHz, d_6 -DMSO): -113,11 (1F, d). ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d_6 -DMSO): 33,39 (1P, s)

Ejemplo 8



Preparación del Compuesto III (Invención)



5 Compuesto 302

Se cargaron a un reactor adecuado el Compuesto 301 (100 g, 0,23 mol) y tetrahidrofurano (1 l). La solución resultante se refrigeró a entre -900 y -100°C bajo nitrógeno usando un baño viscosos de LN₂/IPA, a continuación se trató con n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 99 ml, 0,25 mol) añadido a lo largo de 10 minutos. Se añadió a esto clorofosfito de dietilo (37,1 g, 0,24 mol) a lo largo de 10 minutos. La HPLC (Método 001, TR = 18,9 min.) no mostraba materia prima y mostraba alrededor de 85% de producto. A continuación, la reacción se diluyó con acetato de etilo (1 l) y se dejó calentar hasta -40°C. A continuación, la mezcla se trató con ácido clorhídrico (0,5 M, 590 ml) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Las capas resultantes se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (500 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron hasta un aceite. AUC HPLC 88% (Método 20, TR = 5,8 min) 115 g, > 100% de rendimiento debido a las impurezas y el disolvente. Se usa según está en la siguiente etapa.

Compuesto 303

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 302 (111 g, 0,18 mol estimados), yodocinamonitrilo (47,1 g, 0,175 mol), trietilamina (29,3 ml, 0,21 mol) y tolueno (800 ml). La mezcla resultante se desgasificó rociando con una corriente de nitrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente, tiempo después del cual se añadía tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (10,1 g, 0,0088 mol). La mezcla se roció durante 5 minutos adicionales y a continuación se calentó hasta 80°C durante 2 horas. La HPLC (Método 20, TR = 6,5 min.) mostraba una reacción completa. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de celita y se lavó con acetato de etilo (400 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 500 ml), a continuación se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron hasta un volumen de 350 ml. El concentrado se enfrió hasta 0°C y se agitó a lo largo de 1 hora, tiempo durante el cual el producto cristalizaba. Los sólidos se filtraron y se lavaron con hexano:tolueno (2:1, 150 ml). Se secaron para dejar 95 g, 90% de rendimiento, AUC HPLC 98% (Método 20). Se usó según estaba en la siguiente reacción.

303: $C_{29}H_{26}ClN_2O_6PS$ 597,02 g/mol⁻¹ *m/z* (ESI⁺): 597,0 (MH⁺, 100%), 599,0 (MH⁺, 35%) ¹H NMR δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1,38, 1,48 (2 x 3H, 2 x t, COOCH₂CH₃, POOCH₂CH₃), 2,41 (3H, s, Ar-CH₃), 4,09-4,16 (2H, m, POOCH₂CH₃), 4,52 (2H, q, COOCH₂CH₃), 5,93 (1H, d, CH=CHCN), 7,33-7,38 (3H, m, CH=CHCN, 2 x Ar-H), 7,52 (2H, t, 2 x Ar-H), 7,64 (1H, t, Ar-H), 7,74, 7,77 (2 x 1H, 2 x d, 2 x Ar-H), 7,85 (1H, d, Ar-H), 7,94 (1H, dd, Ar-H), 8,08 (2H, d, 2 x Ar-H) ¹H NMR δ_H (400 MHz, *d*₆-DMSO): 1,26, 1,33 (2 x 3H, 2 x t, COOCH₂CH₃, POOCH₂CH₃), 2,34 (3H, s, Ar-CH₃), 3,95-4,10 (2H, m, POOCH₂CH₃), 4,40 (2H, q, COOCH₂CH₃), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,52 (1H, dd, Ar-H), 7,60-7,84 (8H, m, CH=CHCN, 7 x Ar-H), 8,07 (3 x 1H, m, 3 x Ar-H)

Compuesto 304

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 303 (537 g, 0,90 mol) y cloruro de metileno (2,0 l). La solución resultante se enfrió hasta 0°C y se trató con bromotrimetilsilano (450 g, 2,9 mol) añadido a lo largo de 15 minutos. A continuación, la reacción se calentó hasta 40°C durante 1,5 horas. La HPLC (Método 20, TR = 4,4 min) indicaba una reacción completa. El TMSBr en exceso se separó por arrastre bajo vacío (40-45°C) y el sólido pegajoso resultante se resuspendió en DCM (2,5 l) y se refrigeró hasta 0°C. Se añadió cloruro de oxalilo (156 ml, 1,8 mol) a lo largo de 15 minutos, seguido por *N,N*-dimetilformamida (13,7 ml, 0,18 mol), ambos añadidos a 0°C. Se observaba desprendimiento de gas durante la adición de DMF. Después de 1 hora, la HPLC (Método 20, TR = 6,2 min., muestra extinguida con metanol anhidro antes de la inyección) mostraba una reacción completa. Los disolventes se separaron por arrastre de nuevo para retirar cloruro de oxalilo residual y la mezcla se resuspendió en metanol refrigerado (3,0 l) a 0°-5°C y a continuación se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de dos horas, la HPLC indicaba una reacción completa (HPLC Método 20, TR = 6,2 min). La solución se concentró hasta un volumen de 1,5 l y la suspensión ligera resultante se enfrió hasta 0°C y se diluyó con una solución acuosa de bicarbonato sódico (126 g, 3 l de agua). Después de 2 horas a 5°C, el producto se filtró y se lavó con agua fría/metanol (2:1, 1,5 l) y a continuación se secó para dejar 500 g del Compuesto 304. Pureza por HPLC (Método 20) 92%. Se usó según estaba.

Compuesto 305

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 304 (alrededor de 280 g, 0,48 mol) y tetrahidrofurano (2,8 l). A continuación, la solución resultante se enfrió hasta 5°C y se trató con monohidrato de hidróxido de litio (45 g, 1,07 mol) añadido en una porción. Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente, tiempo durante el cual el color se aclaraba y se formaba un precipitado blanco. Después de agitar durante la noche, la HPLC indicaba una reacción incompleta (Método 20, TR del producto = 4,3, TR parcialmente desprotegido = 5,1, TR de la impureza principal = 3,8). Se añadió LiOH al 10%-H₂O adicional, pero, después de 10 horas, el producto intermedio parcialmente desprotegido seguía en un 5% y el máximo de la impureza a los 3,8 minutos se había incrementado hasta alrededor de 25%. La reacción se enfrió hasta 5°C y se acidificó con ácido clorhídrico (5 N, 280 ml) y a continuación se diluyó con acetato de etilo (2 l). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (500 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1 l) y se secaron con sulfato sódico y a continuación se concentraron para dejar un sólido oleoso bruto, Compuesto 305. Alrededor de 300 g, AUC HPLC 57%.

El producto bruto se recogió en acetonitrilo (1,2 l) a 40°C y el producto se trituró con agua (1,2 l). La suspensión resultante se enfrió hasta 5°C y se dejó granular durante 30 minutos, tiempo después del cual el producto se filtró y se lavó con ACN:H₂O (1:1, 100 ml). Alrededor de 103 g, 88% mediante HPLC. A continuación, el producto se recrystalizó en 360 ml de ACN a 40°C y 360 ml de agua como antes. Se filtró, se lavó y se secó para dejar 75 g del Compuesto 305. AUC HPLC 97%. Se usó según estaba en la siguiente etapa.

Compuesto 306 (resolución quiral)

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 305 (280 g, 0,66 mol) y acetona (4,2 l). La suspensión ligera resultante se trató a continuación con cinconidina (-) (199 g, 0,66 mol) añadida en una porción. Después de una hora, se había formado una solución y, después de una hora adicional, precipitaba un sólido blanco, y la mezcla se dejó agitar durante dos horas adicionales (cuatro horas totales), tiempo después del cual los sólidos se filtraron, se

lavarón con acetona (200 ml) y se secaron para dejar 199 g de la sal decinonidina del Compuesto 306 bruta. La HPLC mostraba una relación de isómeros de 96:4.

La sal bruta se suspendió a continuación en acetato de etilo (3 l) y ácido clorhídrico (1 N, 3 l). La solución bifásica se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 l). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico y se concentraron para dejar el Compuesto 306 en forma de base libre, 107 g, 95:5 mediante HPLC quiral.

A continuación, el Compuesto 306 bruto se suspendió en acetona (1,07 l) y se trató con cinchonidina (-) (76 g, 0,26 mol.) Después de 4 horas de tiempo de agitación total (como anteriormente) los sólidos se filtraron, se lavaron con acetona (200 ml) y se secaron para dejar 199 g de la sal. HPLC 98,6:1,4.

La sal se rompió disolviendo en acetato de etilo (3 l) y ácido clorhídrico (1 N, 3 l). La solución bifásica se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 l). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico y se concentraron para dejar el Compuesto 306 en forma de base libre, 98 g, 98,6:1,4 mediante HPLC quiral. 70% de recuperación del isómero deseado, 35% de rendimiento a partir del Compuesto 306 racémico. N° 6: $C_{20}H_{16}ClN_2O_4P$ 414,78 $gmol^{-1}$ m/z (ESI⁺): 415,1 (MH⁺, 100%), 417,0 (MH⁺, 35%) $[\alpha]_D^{25}$: -47,51 (c, 10,66 $mgml^{-1}$ en EtOAc)

[Enantiómero opuesto $[\alpha]_D^{25}$: +47,26 (c, 9,60 $mgml^{-1}$ en EtOAc)] ¹H NMR δ_H (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,33 (3H, s, Ar-CH₃), 3,71 (3H, d, CH₃OP), 6,50 (1H, d, CH=CHCN), 7,36 (1H, dd, H-6), 7,57 (1H, d, H-7), 7,66-7,71 (2H, m, H-4, Ar-H_{orto}), 7,67 (1H, d, CH=CHCN), 7,84 (1H, d, Ar-H_{orto}), 7,98 (1H, s, Ar-H_{para}), 12,97 (1H, s, N-H), 14,38 (1H, s, an, COOH) Múltiples valores de δ_C indican división de la señal de carbono debido a P. ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d_6 -DMSO): 20,68 (Ar-CH₃), 51,70 (CH₃OP), 98,15 (CH=CHCN), 102,33, 103,85, 114,98, 120,91 (3 x C), 118,47 (CN), 125,39 (C), 126,78 (C), 127,74, 127,86 (C-H_{orto}), 129,78, 129,88 (C), 131,25 (C), 132,06 (C), 133,44, 133,55 (C), 133,89, 134,05 (C), 134,62, 134,75 (C), 135,47, 135,66 (C), 138,78, 138,91 (C), 149,62 (CH=CHCN), 160,40 (C=O) ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d_6 -DMSO): 33,50 (1P, s)

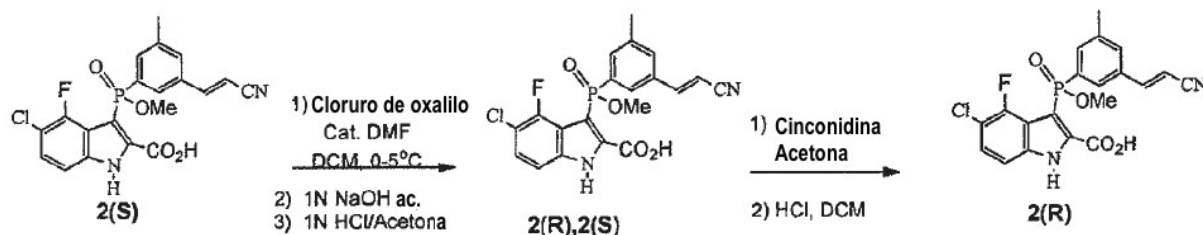
Compuesto III

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 306 (0,63 g, 0,0014 mol) y 1,2-dimetoxietano (10 ml). La mezcla se trató con 1,1-carbonildiimidazol (0,47 g, 0,0028 mol) añadido en una porción, y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que cesaba el desprendimiento de gas (alrededor de 1,5 horas). A continuación, la solución se enfrió hasta 5°C y se roció con amoníaco gaseoso durante 5 minutos. La HPLC (Método 20, TR del producto = 5,0 min.) mostraba una reacción completa después de una hora a temperatura ambiente. La reacción se extinguió mediante la adición de 10 g de hielo picado y se concentró bajo presión reducida para retirar el DME. La suspensión resultante se agitó durante una hora a 5°C para granular el producto. Los sólidos se filtraron y se secaron para dejar el Compuesto III (éster metílico de ácido 2-carbamoi-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil-5-metil-fenil)-(R)-fosfínico) puro como un sólido blanco. 0,56 g, 89% de rendimiento. Pureza química por HPLC (Método 20) 98,5%. Pureza quiral 97%.

Un reactor adecuado se cargó con el Compuesto 306 (10 g, 0,024 mol) y 1,2-dimetoxietano (150 ml). La mezcla se trató con 1,1-carbonildiimidazol (7,8 g, 0,048 mol) añadido en una porción y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que cesaba el desprendimiento de gas. A continuación, la solución se enfrió hasta 5°C y se roció con amoníaco gaseoso durante 5 minutos. La HPLC (Método 20, TR del producto = 5,0 min.) mostraba una reacción completa después de una hora. La reacción de extinguió mediante la adición de 100 g de hielo picado y se concentró bajo presión reducida para retirar el DME. El sólido oleoso resultante (en agua) se diluyó con metanol (20 ml) y se agitó durante una hora a 5°C para granular el producto. Los sólidos se filtraron y se secaron para dejar el Compuesto III (éster metílico de ácido (2-carbamoi-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil)-(R)-fosfínico) puro. 9,8 g, 98% de rendimiento. Pureza química por HPLC (Método 20) 99,5%. Pureza quiral 94,3%. Compuesto III: $C_{20}H_{17}ClN_3O_3P$ 413,79 $gmol^{-1}$ m/z (ESI⁺): 414,1 (MH⁺, 100%), 416,1 (MH⁺, 35%) V_{max} (disco de KBr) (cm^{-1}) 1.620,0 (amida I), 1.670,6 (amida II), 2.218,7 (CN), 3.125,5. 3.291,9 (N-H) $[\alpha]_D^{20}$: -75,08 (c, 9,04 $mgml^{-1}$ en CHCl₃) p. f.: 144-145°C transición hasta un semisólido opaco, 209-210°C se funde Análisis elemental: $C_{20}H_{17}ClN_3O_3P$ calculado C 58,05%, H 4,14%, N 10,15%, Cl 8,57%, P 7,49%. Encontrado C 58,13%, H 4,08%, N 10,16%, Cl 8,69%, P 7,44% ¹H NMR δ_H (400 MHz, d_6 -DMSO): 2,32 (3H, s, Ar-CH₃), 3,74 (3H, d, CH₃OP), 6,52 (1H, d, CH=CHCN), 7,30 (1H, dd, H-6), 7,53-7,58 (3H, m, H-4, H-7, H-6'), 7,68 (1H, d, CH=CHCN), 7,73 (1H, s, H-4'), 7,75 (1H, d, H-2'), 8,02, 10,15 (2x 1H, 2 x s, NH₂), 12,80 (1H, s, N-H) Múltiples valores de δ_C indican división de la señal de carbono debido a P. ¹³C NMR δ_C (100 MHz, d_6 -DMSO): 20,77 (Ar-CH₃), 51,75, 51,81 (CH₃OP), 98,39, 98,91 (C-3), 98,44 (CH=CHCN), 115,05 (C-7), 118,53 (CN), 119,96 (C-4), 124,73 (C-6), 126,68 (C-5), 127,15, 127,26 (C-2'), 129,25, 129,35 (C-9), 131,37 (C-4'), 132,45, 134,04 (C-1'), 132,69, 132,80 (C-6'), 133,92 (C-8), 134,30, 134,44 (C-3'), 139,33, 139,46 (C-5'), 139,96, 140,17 (C-2), 149,55 (CH=CHCN). 160,65 (C=O) ³¹P NMR δ_P (162 MHz, d_6 -DMSO): 33,72 (1P, s)

Ejemplo 9

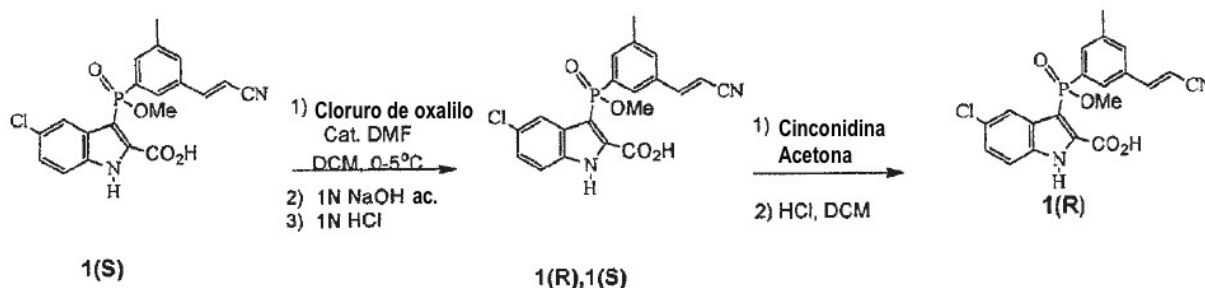
Reciclado del enantiómero S del Compuesto I-2-ácido carboxílico 2(S):



Se añadió cloruro de oxalilo (15,2 ml, 174,2 mmol, 1,4 eq.) gota a gota a lo largo de un período de 5 minutos a una solución fría (0-5°C) del enantiómero de partida 2(S) (50,0 g, 120,8 mmol) en DCM anhidro (300 ml). Se añadió DMF anhidra (1,43 ml, 18,5 mmol) usando una jeringa durante un período de 2 minutos. Se observaba desprendimiento de gas. La solución amarilla resultante se mantuvo agitando bajo una atmósfera de argón a 0-5°C. Después de 60 minutos, el resultado de la HPLC de una parte alícuota de la reacción extinguida con metanol indicaba que solo 10% del ácido de partida estaba sin reaccionar. Después de agitar durante 10 minutos más, la mezcla de reacción se diluyó con DCM frío (0-5°C) (300 ml). La mezcla diluida se transfirió rápidamente a un embudo de adición y se añadió a una solución acuosa de NaOH (1 N, 695 ml) en agitación a lo largo de un período de 7 minutos. La temperatura de la mezcla en extinción ascendía (desde 26,5°C, temperatura de partida del NaOH acuoso) hasta 33°C cuando se completaba la adición. Después de la agitación continua durante 3 minutos adicionales, el líquido de la capa superior se decantaba. La capa inferior (que contenía sal precipitada) se concentró bajo presión reducida para retirar el DCM. El residuo se recogió en acetona (300 ml) y se acidificó usando HCl 1 N (se añadieron 275 ml totales) hasta pH 4. La mezcla resultante se agitó a temperatura normal durante 30 minutos. El producto sólido se recogió mediante filtración, el sólido se lavó con acetona/agua desionizada 1:1 (100 ml). El sólido obtenido se secó en un horno de vacío a 45°C a lo largo de 18 horas. Peso neto de este material de la 1ª fracción = 31,4 g. Pureza química = 98,4% por HPLC (AUC). El resultado de la HPLC quiral indicaba una mezcla de 2(R) (51,7%) y 2(S) (47,5%). El espectro de ¹H-NMR indicaba un producto puro con una traza de DCM.

Recuperación de producto de la 2ª fracción de las aguas madres del producto de la 1ª fracción: estaban presentes dos capas en las aguas madres. Las capas se separaron. La capa superior se extrajo con DCM (400 ml). La capa inferior de las aguas madres de la 1ª fracción (aceite pardo, principalmente producto por HPLC) se recogió en tolueno (30 ml) y se lavó con una mezcla de HCl 1 N (5 ml) y salmuera (15 ml). La capa de tolueno se combinó con el extracto de DCM, se lavó con agua desionizada (400 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro. Los disolventes se retiraron bajo presión reducida. El material de la 2ª fracción se secó bajo alto vacío durante 16 horas. Peso neto = 15,1 g. Pureza química = 90% por HPLC (AUC). El resultado de la HPLC quiral indicaba una mezcla de 2(R) (91,4%) y 2(S) (8,6%). El espectro de ¹H-NMR indicaba principalmente producto con tolueno residual (5,3% en peso) y una traza de impurezas secundarias. Recuperación total de ácido libre (mezcla de 2 enantiómeros) = 92%.

Reciclado del enantiómero S del Compuesto III-2-ácido carboxílico 1(S):

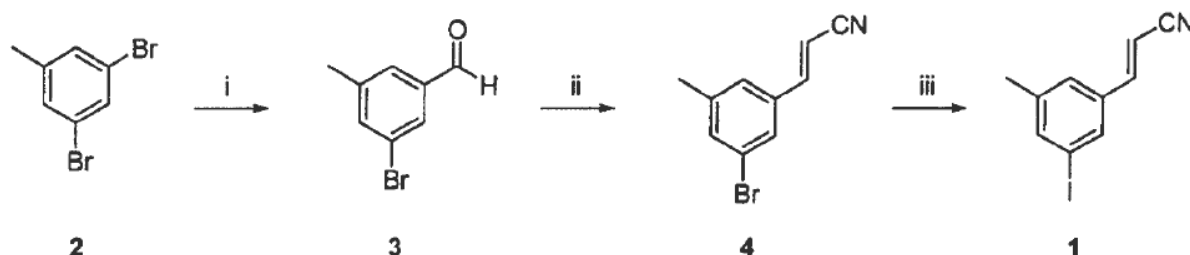


Se añadió cloruro de oxalilo (15,7 ml, 180 mmol, 1,5 eq.) gota a gota a lo largo de un período de 5 minutos a una solución turbia fría (0-5°C) del enantiómero de partida 1(S) (50,0 g, 120,8 mmol) en DCM anhidro (300 ml). Se añadió DMF anhidra (1,45 ml, 18,8 mmol) usando una jeringa a lo largo de un período de 2 minutos. Se observaba desprendimiento de gas. La solución amarilla resultante se mantuvo agitando bajo atmósfera de argón a 0-5°C durante 30 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (300 ml) y se transfirió rápidamente a un embudo de adición. La mezcla de reacción diluida se añadió a una solución acuosa de NaOH (1 N, 725 ml) en agitación a lo largo de un período de 6 minutos. La temperatura de la mezcla en extinción ascendía (desde 24,5°C, temperatura de partida del NaOH acuoso) hasta 33°C cuando se completaba la adición. Después de la agitación continua durante 5 minutos adicionales, la mezcla extinguida se puso sobre un baño de hielo, se añadió HCl 1 N (365 ml) a través de un embudo de adición a lo largo de 2 minutos. La mezcla acidificada (pH = 2) resultante se agitó

durante 5 minutos. Las capas se separaron usando un embudo de separación. La fase acuosa se extrajo adicionalmente con DCM (200 ml x 2). La capa orgánica y los extractos de DCM se combinaron. Se lavaron con agua desionizada (200 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro. El DCM se retiró bajo presión reducida. El producto bruto se secó en un horno de vacío durante 42 horas. Peso neto = 52,4 g. Pureza química >97% por HPLC (AUC). El resultado de la HPLC quiral indicaba una mezcla de 1(R) (64,1%) y 1(S) (35,9%), El espectro de $^1\text{H-NMR}$ indicaba producto puro con DCM residual (4,3% en peso) y una traza de DMF. Recuperación de ácido libre (mezcla de 2 enantiómeros) = 100%.

Ejemplo 10

Preparación de yodocinamonitrilo



3-Bromo-5-metil-benzaldehído (3)

Se añadió tolueno anhidro (365 ml) a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 3 l equipado con agitador superior, un embudo de adición de 250 ml y uno de 1 l, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. El matraz se sumergió en un baño de hielo/metanol a fin de mantener la temperatura interna en la región de -15°C. Se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexano, 232 ml, 0,581 mol) al matraz a través de una jeringa, bajo argón a una velocidad de agitación moderada. Se introdujo cloruro de n-butilmagnesio (2,0 M en THF, 145 ml, 0,290 mol, solución parda clara) en el embudo de adición de 250 ml a través de una jeringa, bajo argón. La adición de esta solución se realizó gota a gota a lo largo de 22 minutos, tiempo durante el cual la temperatura interna ascendía de -16°C a -13°C y la mezcla se volvía de transparente a amarillo claro opaco. La solución se agitó durante 0,5 h más a -13°C.

Una solución de 3,5-dibromotolueno (196 g, 0,784 mol; Aldrich) en tolueno anhidro (1.458 ml) se preparó en un matraz de fondo redondo de una boca de 2 l bajo argón. Esta solución amarillo claro se transfirió en dos porciones al embudo de adición de 1 l. La adición de esta solución se realizó gota a gota a lo largo de 50 minutos, tiempo durante el cual la temperatura interna se mantenía entre -13°C y -17°C y la mezcla se volvía de un color naranja-pardo opaco más oscuro. La suspensión se agitó durante 2,75 h más entre -13°C y -17°C bajo argón. Se tomó una muestra de HPLC después de 2 h y se preparó mediante la adición de 2 gotas de metanol, seguido por retirada del disolvente bajo presión reducida. El método de HPLC Prueba 20 indicaba que no quedaba materia prima (Tr 6,64 min.) y quedaba una mezcla de productos intermedios (Tr 4,94 min., 6,15 min., 7,40 min.). Esta suspensión se etiquetó como 'Mezcla A'.

Durante la adición del 3,5-dibromotolueno, se añadió *N,N*-dimetilformamida anhidra (78,7 ml, 1,016 mol) a través de una jeringa a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 l equipado con agitador superior, un embudo de adición de 1 l, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. El matraz se sumergió en un baño de hielo/metanol a fin de mantener la temperatura interna en la región de -15°C. Se añadió tolueno anhidro (91 ml) al matraz a través de una jeringa, bajo argón a una velocidad de agitación moderada. Esta solución se etiquetó como 'Mezcla B'.

La Mezcla A se transfirió en dos porciones (2 x 950 ml) al embudo de adición de 1 l del matraz de 5 l que contenía la Mezcla B. El embudo de adición se envolvió con papel de aluminio para evitar la entrada de calor excesiva. La adición de la Mezcla A se realizó gota a gota a lo largo de 38 minutos, tiempo durante el cual la temperatura de reacción interna se mantenía entre -16°C y -12°C y la reacción se volvía una solución naranja. La solución se agitó durante 1 h más entre -13°C y -16°C bajo argón, tiempo después del cual se preparó una muestra de HPLC retirando el tolueno bajo presión reducida, disolviendo en MeOH y separando por filtración cualquier material insoluble. El método de HPLC Prueba 20 indicaba un producto principal (Tr 5,42 min).

Se consideraba que la reacción era completa y fácil de extinguir.

Una solución preparada de ácido cítrico (341.54 g) en agua (650 ml) en un matraz cónico de 1 l se añadió lentamente a lo largo de 20 minutos a la mezcla de reacción en porciones de 50 ml, manteniendo la temperatura interna por debajo de 0°C. Esta solución amarilla se agitó a 0°C durante 20 minutos más.

Después de este tiempo, la mezcla de reacción extinguida se transfirió a un embudo de separación de 4 l y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con agua (650 ml) y salmuera saturada (550 ml) antes de secarse mediante la adición de sulfato sódico anhidro (500 g). El agente de secado se retiró mediante filtración a vacío. La capa orgánica secada se transfirió en dos porciones a un matraz de fondo redondo de 3 l y los disolventes se retiraron bajo alto vacío a 35°C. Se obtenía un aceite rojo-naranja de baja viscosidad, 3-bromo-5-metil-benzaldehído (159,1 g, 102% de rendimiento). C_8H_7BrO 199,04 $g\cdot mol^{-1}$; HPLC: Tr 5,42 min.; 96% de pureza a 272 nm; 1H NMR δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 2,41 (3H, s, CH_3), 7,58, 7,60, 7,81 (3 x 1H, 3 x s, 3 x Ar-H), 9,92 (1H, s, CHO); ^{13}C NMR δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 21,17 (CH_3), 123,27 (C-3), 129,15, 129,93 (C-2, C-6), 138,06 (C-1), 138,11 (C-4), 141,33 (C-5), 191,20 (CHO).

3-Bromo-5-metil-cinamonitrilo (4)

Se añadió hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral, 39,2 g, 0,980 mol) a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 5 l equipado con un agitador superior, un embudo de adición de 250 ml, una sonda para la temperatura interna y una entrada de argón. Se añadió tetrahidrofurano anhidro (2,6 l) al matraz bajo argón y la agitación comenzó a una velocidad moderada para dar una suspensión opaca blanca. Se introdujo cianometilfosfonato de dietilo (152,1 ml, 0,941 mol, líquido amarillo claro ligeramente viscoso) en un embudo de adición de 250 ml, bajo argón. La adición del fosfonato se realizó gota a gota a lo largo de 56 minutos, tiempo durante el cual la temperatura interna ascendía de 21°C a 29°C y la mezcla se convertía en una suspensión amarilla muy clara menos opaca. La solución se agitó durante 1 h adicional, tiempo durante el cual la temperatura interna disminuía de 29°C a 22°C y la mezcla se convertía en una solución transparente de color amarillo claro.

Se transfirió 3-bromo-5-metil-benzaldehído (159 g, 0,784 mol, aceite rojo supuestamente cuantitativo) desde su matraz de fondo redondo de 3 l al embudo de adición de 250 ml mediante vertido. El matraz se enjuagó con tetrahidrofurano anhidro (3 x 5 ml). Los tres enjuagues también se vertieron en el embudo de adición, que a continuación se barrió con argón. La adición del aldehído se realizó gota a gota bajo argón, a lo largo de 71 minutos, tiempo durante el cual la temperatura interna ascendía de 20°C a 33°C y la mezcla se convertía en una solución naranja oscuro.

La solución se agitó durante 2 h más, tiempo durante el cual la temperatura interna disminuía de 32°C a 19°C. Se preparó una muestra de HPLC de la solución parda oscura en 1 h diluyendo con THF. El método de HPLC Prueba 20 indicaba una conversión completa de la materia prima (Tr 5,42 min.) en un producto principal con una mezcla 10:1 de isómeros E:Z (272 nm, Tr 5,76 min.; Tr 5,83 min. E).

Se mezclaron ácido clorhídrico (6 N, 21,66 ml) y agua (2.578,33 ml) en un matraz cónico de 4 l para dar una solución acuosa de HCl 0,05 M (2,6 l).

La mezcla de reacción se diluyó con terc-butil-metil-éter (0,5 l) y se extinguió con HCl acuoso 0,05 M (0,5 l), después de lo cual la temperatura interna ascendía hasta 22°C. La mezcla de reacción parcialmente extinguida se transfirió a un embudo de separación de 22 l. El residuo procedente del recipiente de reacción se transfirió al embudo de separación mediante enjuague consecutivo con terc-butil-metil-éter (1,5 l), HCl acuoso 0,05 M (1,0 l), terc-butil-metil-éter (2,0 l), HCl acuoso 0,05 M (1,1 l), terc-butil-metil-éter (1,2 l). Las capas se agitaron durante 30 segundos, se dejó que los gases escaparan periódicamente y la capa acuosa se separó en un matraz de 22 l. La capa orgánica se lavó con agua (2,0 l) y las capas acuosas se combinaron. La capa orgánica se secó con sulfato sódico anhidro (500 g) durante 10 minutos y el agente de secado se separó por filtración a continuación bajo vacío. Los disolventes se retiraron bajo presión reducida para dar un sólido amarillo claro, que se secó durante la noche bajo vacío a 30°C. El material bruto resultante (200,2 g) era un sólido amarillo pulverulento pero ligeramente pegajoso.

El sólido amarillo bruto (200 g), en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l equipado con una sonda para la temperatura interna, un embudo de adición de 500 ml y un agitador superior, se disolvió en metanol (700 ml) mediante inmersión en un baño de agua a 50°C. Al disolverse, el sólido amarillo se convertía en una solución roja-naranja. El baño de agua se retiró y se introdujo agua (250 ml) en el embudo de adición de 500 ml. La adición del agua se realizó gota a gota con una velocidad de agitación moderada, a lo largo de 3 h, tiempo durante el cual la temperatura interna disminuía de 50°C a 25°C. Un sólido amarillo empezó a precipitar de la solución roja-naranja después de cinco minutos y la adición de 50 ml de agua. Las aguas madres se verificaron periódicamente mediante HPLC para determinar la relación de isómeros E:Z todavía en solución. Después de añadir 250 ml de agua la relación de E:Z era 1:1,2 y se determinó que era favorable. La suspensión se enfrió en un baño de hielo durante 10 minutos dejando que la temperatura interna disminuyera hasta 17°C, antes de ser filtrada a través de un embudo de vidrio sinterizado de 3 l bajo presión reducida. El sólido resultante se lavó con una solución fría de metanol:agua (1:1,2 x 50 ml, 5-10°C). El sólido se secó hasta peso constante en un horno de vacío a 35°C. Se obtuvo un sólido amarillo claro, 3-bromo-5-metil-cinamonitrilo (144,1 g, 83% de rendimiento). Sin embargo, este material estaba contaminado con el aceite mineral no retirado, según se observaba en los espectros de NMR de protón y carbono. 3-Bromo-5-metil-cinamonitrilo: $C_{10}H_8BrN$ 222,08 $g\cdot mol^{-1}$; HPLC: Tr del isómero E 5,83 min.; 97% de pureza a 272 nm. Tr del isómero Z 5,76 min.; ~1,7% a 272 nm; 1H NMR δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 2,36 (3H, s, CH_3), 5,86 (1H, d, $J_{H,H}$ 16,7, $CH=CHCN$), 7,17 (1H, s, Ar-H), 7,28 (1H, d, $J_{H,H}$ 16,7, $CH=CHCN$), 7,39 (2 x 1H, s, 2 x Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 21,23 (CH_3), 97,86 ($CH=CHCN$), 117,89 (CN), 123,19 (C-3), 127,03, 127,38 (C-4, C-6), 134,85 (C-2), 135,38 (C-1), 141,16 (C-5), 149,31 ($CH=CHCN$).

3-Yodo-5-metil-cinamonitrilo (1)

5 Tres matraces de presión que se pueden cerrar herméticamente, de cuello roscado, de 500 ml (etiquetados como A, B y C) se equiparon individualmente con un agitador magnético y se dispusieron sobre baños de aceite calentados hasta 115°C. Se añadieron separadamente y secuencialmente a cada matraz; 3-bromo-5-metil-cinamonitrilo (3 x 47,5 g, 3 x 0,214 mol); m-xileno (3 x 171 ml), dando una solución naranja; éter dimetilico de dietilenglicol (3 x 43 ml); yoduro sódico (3 x 64,12 g, 3 x 0,428 mol); yoduro de cobre (I) (3 x 4,08 g, 3 x 0,0214 mol); y finalmente *N,N'*-dimetiletilendiamina (3 x 4,60 ml, 3 x 0,0427 mol), punto en el cual el color se volvía verde oscuro-negro. El cuello aterrajado de cada matraz se enjuagó con m-xileno (3 x 1 ml). El yoduro sódico sólido insoluble endurecido se movilizó con una espátula, mientras la solución se desgasificaba: Corrientes estables de argón se burbujearon a través de las soluciones en cada matraz durante 10 minutos.

Los tres matraces se cerraron herméticamente bajo una atmósfera de argón y se metieron en sus respectivos baños de aceite a 115°C, asegurando una velocidad de agitación moderada en cada uno. Las reacciones se dejaron agitar a 115°C, tras un blindaje contra explosiones, durante 14 h por la noche.

15 Después de este tiempo, se encontró que el matraz C había detenido la agitación. Los matraces se dejaron enfriar al aire durante 5 minutos antes de abrir. Se prepararon muestras para HPLC de las tres reacciones retirando el m-xileno bajo presión reducida y disolviendo en MeCN. El análisis se realizó usando el método de HPLC Prueba 20;

Matraz A: Producto principal (Tr 5,97 min.), 2,5% de materia prima (Tr 5,83 min.).

Matraz B: Producto principal (Tr 5,97 min.), 1,0% de materia prima (Tr 5,83 min.).

Matraz C: Producto principal (Tr 5,97 min.), 20% de materia prima (Tr 5,83 min.).

20 Los tres matraces se desgasificaron burbujando corrientes estables de argón a través de las mezclas de reacción respectivas durante 10 minutos. Los tres matraces se cerraron herméticamente bajo una atmósfera de argón y se metieron en sus respectivos baños de aceite a 120°C, asegurando una velocidad de agitación moderada en cada uno. Se dejó que las reacciones se agitaran a 120°C, tras un blindaje contra explosiones durante 2 h.

25 Después de este tiempo, los matraces se dejaron enfriar al aire durante 5 minutos antes de abrir. Se prepararon muestras para HPLC de las tres reacciones retirando el m-xileno bajo presión reducida y disolviendo en MeCN. El análisis se realizó usando el método de HPLC Prueba 20;

Matraz A: Producto principal (Tr 5,97 min.), 1,9% de materia prima (Tr 5,83 min.).

Matraz B: Producto principal (Tr 5,97 min.), 0,9% de materia prima (Tr 5,83 min.).

Matraz C: Producto principal (Tr 5,97 min.), 7,5% de materia prima (Tr 5,83 min.).

30 Se consideraba que las reacciones A y B eran completas y se dejaron enfriar hasta temperatura normal. El matraz C se desgasificó de nuevo burbujando una corriente estable de argón a través de la mezcla de reacción durante 10 minutos. El matraz se cerró herméticamente bajo una atmósfera de argón y se metió en el baño de aceite a 125°C, asegurando una velocidad de agitación moderada. La reacción se dejó agitar a 125°C, tras un blindaje contra explosiones, durante 4 h más.

35 Después de este tiempo, el Matraz C se dejó enfriar al aire durante 5 minutos antes de abrir. Se preparó una muestra para HPLC de la reacción retirando el m-xileno bajo presión reducida y disolviendo en MeCN. El análisis se realizó usando el método de HPLC Prueba 20;

Matraz C: Producto principal (Tr 5,97 min.), 2,0% de materia prima (TR 5,83 min.).

Se consideraba que la reacción C era completa y se dejó enfriar hasta temperatura normal,

40 El Matraz A se diluyó con terc-butil-metil-éter (2 x 150 ml) y la mezcla se filtró bajo vacío, para retirar los materiales insolubles, a través de un embudo de vidrio sinterizado de 3 l que contenía Celite (1,5 l), prelavado con terc-butil-metil-éter.

45 Los Matraces B y C se diluyeron de forma similar y se filtraron a través del mismo embudo sinterizado de Celite combinando los tres filtrados A, B y C en un matraz cónico de 12 l. Los matraces se enjuagaron y la Celite se eluyó con terc-butil-metil-éter (3 l).

Los filtrados combinados se refiltraron bajo vacío a través de un embudo de vidrio sinterizado de 3 l limpio que contenía Celite reciente (1,5 l), se prelavaron con terc-butil-metil-éter, para retirar los materiales en partículas turbias restantes. La elución se realizó con terc-butil-metil-éter (4 l). El filtrado de color rojo-pardo transparente resultante era estable, almacenándose a 4°C durante 48 h.

50 El filtrado se concentró bajo presión reducida a 40°C y los disolventes de alto punto de ebullición se retiraron a

continuación bajo alto vacío a 45°C. La coevaporación con metanol (2 x 50 ml) daba un sólido pardo bruto (203 g).

El sólido pardo bruto (200 g), en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l equipado con sonda para la temperatura interna, embudo de adición de 500 ml y agitador superior, se disolvió en metanol (700 ml) mediante inmersión en un baño de agua a 53°C. Al disolverse, el sólido pardo se convertía en una solución roja-parda. El baño de agua se retiró y se introdujo agua (300 ml) en el embudo de adición de 500 ml. La adición del agua se realizó gota a gota con una velocidad de agitación moderada, a lo largo de 3 h, tiempo durante el cual la temperatura interna disminuía de 50°C a 24°C. Empezó a precipitar un sólido amarillo-pardo en la solución roja-parda después de diez minutos y la adición de 80 ml de agua. Las aguas madres se verificaron periódicamente mediante HPLC para determinar la relación de isómeros E:Z todavía en solución. Después de añadir 300 ml de agua la relación de E:Z era 1:1,1 y se determinó que era favorable. La suspensión se enfrió durante 14 h dejando que la temperatura interna disminuyera hasta 4°C, antes de filtrarse a través de un embudo de vidrio sinterizado de 3 l bajo presión reducida. El sólido resultante se lavó con una solución fría de metanol:agua (1:4, 100 ml y a continuación 200 ml, 5°C). El sólido se secó hasta peso constante en un horno de vacío a 35°C. Se obtuvo un sólido pardo claro, 3-yodo-5-metil-cinamonitrilo (149,4 g, 86% de rendimiento). Sin embargo, este material estaba contaminado con el aceite mineral no retirado, según se observaba en los espectros de NMR de protón y carbono.

El sólido pardo ligeramente pegajoso (148,8 g), en un matraz cónico de 2 l, se disolvió en acetonitrilo (1,5 l) para dar una solución naranja oscuro-parda con glóbulos insolubles de aceite mineral. Esta mezcla se filtró bajo gravedad a través de papel de filtro (Whatman, 541) retirando la mayoría del aceite mineral (10,6 g). El filtrado se transfirió a un embudo de separación de 4 l y se lavó con heptano (0,5 l). La capa de heptano se extrajo con acetonitrilo (250 ml) y se concentró bajo presión reducida para dar más aceite mineral (3,2 g). Las capas de acetonitrilo se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron en un horno de vacío a 35°C dando 3-yodo-5-metil-cinamonitrilo (132,5 g, 77% de rendimiento) como un sólido pardo claro. Se observaba mediante los espectros de NMR de protón y carbono que este material estaba libre de todo el aceite mineral. 3-Yodo-5-metil-cinamonitrilo: $C_{10}H_8IN$ 269,08 $g\cdot mol^{-1}$; P. F.: 98°C se reblandece, 99-100°C se funde; HPLC (Acetonitrilo): Tr del isómero E 5,97 min.; 97% de pureza a 272 nm (3-Bromo-5-metil-cinamonitrilo, Tr del isómero E 5,83 min.; ~1,4% a 272 nm.); 1H NMR δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 2,33 (3H, s, CH_3), 5,85 (1H, d, $J_{H,H}$ 16,7, $CH=CHCN$), 7,20 (1H, s, Ar-H), 7,25 (1H, d, $J_{H,H}$ 16,7, $CH=CHCN$), 7,59, 7,60 (2 x 1H, 2 x s, 2 x Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 21,09 (CH_3), 94,93 (C-3), 97,70 ($CH=CHCN$), 117,91 (CN), 127,61 (C-6), 133,37 (C-2), 135,44 (C-1), 140,81 (C-4), 141,15 (C-5), 149,18 ($CH=CHCN$).

Ejemplo 11

Configuración absoluta del Compuesto III (éster metílico de ácido 2-carbamoyl-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico)

Se suspendieron 5 mg de Compuesto III en 50 ml de anisol. Se formaban cristales adecuados para el análisis por rayos X de cristales simples después de 2 días. Los cristales eran monoclinicos con un grupo espacial de P21 y dimensiones de la celdilla unitaria de $a = 13,0983 \text{ \AA}$, $b = 10,9625 \text{ \AA}$, $c = 16,4266 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 103,6063^\circ$ y $\gamma = 90^\circ$. En el cristal, la unidad asimétrica contenía dos moléculas independientes de compuesto III (molécula A y molécula B), y una sola molécula parcialmente ocupada, (alrededor de 86%), de anisol como disolvente. El parámetro de Flack se determinó como -0,04(7) para la molécula A y 1,04(7) para la molécula B. Basándose en la determinación previa, se asignó la estereoquímica absoluta, y los centros quirales en P1A y P1B estaban ambos en la configuración R. La FIG. 2A proporciona una vista de la molécula A que incluye la estereoquímica en P1A, y la FIG. 2B proporciona una vista de la molécula B que incluye la estereoquímica en P1B.

Ejemplo 12

Farmacología del Compuesto I (éster metílico de ácido 2-carbamoyl-5-cloro-4-fluoro-1H-indol-3-il)-[3-(E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico) y el Compuesto III (éster metílico de ácido 2-carbamoyl-5-cloro-1H-indol-3-il)-[3-((E)-2-ciano-vinil)-5-metil-fenil]-(R)-fosfínico)

Las siguientes Tablas muestran la actividad anti-HIV in vitro de los 3-fosfoindoles enantiómeramente puros de los compuestos I y III en ensayos, incluyendo análisis de resistencia a los fármacos probados. La Tabla I muestra la actividad de los compuestos contra un grupo de enzimas transcriptasa inversa de HIV-1 mutantes. La actividad antiviral de los compuestos 3-fosfoindólicos del compuesto I y el compuesto III se compara con la actividad de los compuestos compuesto de control EFV (efavirenz, 6-cloro-4-ciclopropiletinil-1-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona) con diversos virus.

Como se muestra en la Tabla 1, el Compuesto I inhibía la enzima transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés) de HIV-1 (subtipo B, cepa BH10) con valores medios de la concentración inhibidora al 50% (IC_{50}) que variaban de $0,366 \pm 0,251 \mu M$ (RT natural) a $1,411 \pm 0,873 \mu M$ (K103N/Y181C). De forma similar, las IC_{50} del Compuesto III variaban de $0,343 \pm 0,083 \mu M$ (RT natural) a $1,614 \pm 0,279 \mu M$ (K103N/Y181C). El Compuesto I y el Compuesto III no eran inhibidores para polimerasas α humanas ($IC_{50} \geq 145 \mu M$), β ($IC_{50} \geq 422 \mu M$) o γ ($IC_{50} \geq 60 \mu M$) como se observa en la Tabla 5, demostrando la selectividad de los compuestos de prueba. Los estudios cristalográficos con el Compuesto I y el mutante doble de RT de HIV K103N/Y181C revelaban que el Compuesto I se une al bolsillo de

NNRTI hidrófobo conocido.

En ensayos de cultivo celular de HIV-1, usando células MT-4 y un HIV-1 subtipo B (cepa BH-10), el Compuesto I y el Compuesto III inhibían la producción de HIV con valores medios de la concentración eficaz al 50% (EC₅₀) de 1 nM y 1,2 nM, respectivamente (véase la Tabla 6). En ensayos realizados en PBMC humanas, el Compuesto I y el Compuesto III inhibían la producción de HIV-1 con una EC₅₀ media de 0,4 nM (cepa BH-10) o 1,5 nM (cepa NL4-3). Contra 3 cepas virales de HIV-1 diferentes en 5 líneas celulares humanas huésped diferentes, el intervalo de EC₅₀ determinado para el Compuesto I era 0,5-2,0 nM y para el Compuesto III era 0,5-1,7 nM. El Compuesto I y el Compuesto III eran activos contra un grupo de 9 subtipos de HIV-1 diferentes con una potencia respectiva de 0,25 a 3,2 nM y de 0,2 a 2,14 nM. Las actividades del Compuesto I y el Compuesto III se reducían 24,8 y 19,5 veces, respectivamente, en presencia de glicoproteína ácida α -1 y suero humano al 45%.

En una prueba de citotoxicidad de 4 días en 6 líneas celulares huésped de HIV-1 humanas, el Compuesto I y el Compuesto III mostraba valores medios de la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) de 16,6 a 32,9 μ M y de 14,8 a 50,0 μ M, respectivamente. En las PBMC, se determinaron valores de CC₅₀ de 52,6 (Compuesto I) y 66,9 μ M (Compuesto III). En una prueba de 9-12 días en líneas celulares HeLa, HuH7 y HepG2, los valores de CC₅₀ del Compuesto I y el Compuesto III estaban en el intervalo de 23,5 a 31,5 μ M. Basándose en las relaciones de CC₅₀/EC₅₀ determinadas en células MT-4, se calcularon valores del índice de selectividad (SI, por sus siglas en inglés) de >22.000 y >18.000 para el Compuesto III y el Compuesto I, respectivamente.

En una prueba de resistencia cruzada que usaba una variedad de líneas celulares y cepas de HIV-1, el Compuesto I y el Compuesto III retenían buena potencia contra virus resistentes a NNRTI que tenían mutaciones K103N, Y181C o K103N/Y181C (valores de EC₅₀ respectivos por debajo de 4,5 y 14,5 nM), mientras que el EFV mostraba una resistencia considerable contra el doble mutante en particular (valores de EC₅₀ de 36 a 116 nM).

El perfil de resistencia del Compuesto I y el Compuesto III se examinó con mayor profundidad usando 3 grupos de virus diferentes en la prueba realizada por Monogram BioSciences (anteriormente ViroLogic): un grupo de detección sistemática de virus de poco a moderadamente resistentes a EFV; un grupo de 8 virus altamente resistentes a EFV y un grupo de amplio espectro de 64 virus incluyendo 40 virus resistentes a NNRTI con mutantes de resistencia simples, dobles y triples. El Compuesto I y el Compuesto III eran altamente activos contra un subgrupo de mutantes que tienen las mutaciones NRTI y PI. El Compuesto I y el Compuesto III eran superiores a EFV esencialmente contra todos los virus resistentes a EFV, incluyendo virus con mutantes dobles y triples. El Compuesto I era 2-3 más potente que el Compuesto III contra virus resistentes a EFV con mutantes dobles y triples.

En una serie de estudios de interacción in vitro, no se observaba interacción negativa entre el Compuesto I y el Compuesto III y 7 NRTI o 6 PI aprobados para la terapia de HIV-1 en la clínica.

Farmacodinámica primaria

Lista de abreviaturas

	IIIB	Cepa de laboratorio de HIV-1 usada comúnmente
35	A98	Alanina en la posición 98 de RT
	AAG	Glicoproteína ácida α -1
	sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
	AZT	Zidovudina
	BH10	Cepa adaptada al laboratorio de virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
40	CC ₅₀	Concentración citotóxica al 50%
	CPE	Efecto citopático
	DNA	Ácido desoxirribonucleico
	DSA	Ensayo de sensibilidad a fármacos
	E138K	Cambio de glutamato por lisina en la posición 138 de la RT
45	EC ₅₀	Concentración eficaz al 50%
	EFV	Efavirenz
	ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
	F227F/L	Fenilalanina/leucina en la posición 227 de la RT

	FBS	Suero bovino fetal
	G190A	Cambio de glicina por alanina en la posición 190 de la RT
	G190A/G	Cambio glicina/alanina en la posición 190 de la RT
	G190S	Cambio de glicina por serina en la posición 190 de la RT
5	GLP	Prácticas de laboratorio adecuadas
	H9	Línea de células T humana derivada de un paciente con linfoma de células T
	HepG2	Línea celular de hepatoma humano
	HeLa	Línea celular humana aislada de un paciente con adenocarcinoma
	HIV, HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
10	HIV-2	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2
	HS	Suero humano
	HuH7	Línea celular de hepatoma humano
	IC ₅₀	Concentración inhibidora al 50%
	IND	Aplicación a "Investigational New Drugs" (Productos en fase de investigación clínica)
15	K101E	Cambio de lisina por glutamato en la posición 101 de la RT
	K103N	Cambio de lisina por asparagina en el residuo 103 de la RT
	K103R	Cambio de lisina por arginina en el residuo 103 de la RT
	K103S	Cambio de lisina por serina en la posición 103 de la RT
	L100I	Cambio de leucina por isoleucina en la posición 100 de la RT
20	M184V	Cambio de metionina por valina en la posición 184 de la RT
	mg	Miligramo
	MOLT-4	Células T humanas aisladas de un paciente con leucemia
	MT-2	Células T humanas aisladas de un paciente con leucemia de células T del adulto
	MT-4	Células T humanas aisladas de un paciente con leucemia de células T del adulto
25	MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna)
	MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
	NAM	Mutación asociada a nucleósidos
	NL4-3, 4595	Cepa de laboratorio de HIV-1 usada comúnmente
	nM	Nanomolar
30	NNRTI	Inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico
	NRTI	Inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídico/nucleotídico
	P225H	Cambio de prolina por histidina en el residuo 225 de la RT
	P227L	Cambio de prolina por leucina de la posición 227 de la RT
	P236L	Cambio de prolina por leucina en la posición 236 de la RT
35	p24	Proteína nuclear p24 de HIV
	p28	Proteína nuclear p28 de SIV

	PI	Inhibidor de proteasa
	PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
	RC	Capacidad de replicación
	ROD	Cepa de laboratorio de HIV-2 usada comúnmente
5	RT	Transcriptasa inversa
	SD	Desviación estándar
	SI	Índice de selectividad
	SIV	Virus de inmunodeficiencia símico
	U937	Línea celular de monocitos humanos aislada de un paciente con linfoma
10	V106A	Cambio de valina por alanina en la posición 106 de la RT
	V106M	Cambio de valina por metionina en la posición 106 de la RT
	V108I	Cambio de valina por isoleucina en la posición 108 de la RT
	V179D	Cambio de valina por ácido aspártico en el residuo 179 de la RT
	WT, W.T., wt	Natural
15	Y181C	Cambio de tirosina por cisteína en el residuo 181 de la RT
	Y181V	Cambio de tirosina por valina en la posición 181 de la RT
	Y188L	Cambio de tirosina por leucina en la posición 188 de la RT
	µg	Microgramo
	µM	Micromolar
20	Actividad antiviral in vitro contra la enzima RT de HIV	

Los perfiles de actividad del Compuesto I, el Compuesto III y EFV contra RT de HIV se determinaron usando un grupo de ensayos de transcriptasa inversa (RT) de HIV in vitro como se muestra en la Tabla 1. Estos estudios empleaban enzima RT de HIV natural derivada de HIV subtipo B (cepa BH-10), junto con un grupo estándar de enzimas con mutación dirigida resistentes a NNRTI con sustituciones K103N e Y181C solas o en combinación.

25 Cuando se probaba in vitro, el Compuesto I inhibía la transcripción inversa de HIV con valores de IC_{50} que variaban de $0,366 \pm 0,251 \mu M$ (RT natural) a $1,411 \pm 0,873 \mu M$ (K103N/Y181C). De forma similar, las IC_{50} derivadas del Compuesto III variaban de $0,343 \pm 0,083 \mu M$ (RT natural) a $1,614 \pm 0,279 \mu M$ (K103N/Y181C). El EFV daba el perfil de inhibición in vitro esperado que exhibe actividad natural contra Y181C pero se deterioraba mucho la actividad contra enzimas mutantes K103N y K103N/Y181C.

30 Tabla 1

Actividad contra RT de HIV-1 en un ensayo enzimático

Compuesto	N	Valores de IC_{50} promedio (μM) $\pm$ Desviación estándar			
		W.T. ^a	Y181C ^b	K103N ^b	Y181C/K103N ^b
I	4	$0,366 \pm 0,251$	$0,526 \pm 0,285$	$0,782 \pm 0,801$	$1,411 \pm 0,873$
III	5	$0,343 \pm 0,083$	$0,361 \pm 0,086$	$2,203 \pm 1,259$	$1,614 \pm 0,279$
EFV	4	$0,055 \pm 0,019$	$0,0765 \pm 0,047$	$1,7973 \pm 0,19$	$1,4313 \pm 0,31$

IC_{50} = concentración inhibidora que reduce la actividad de la enzima en 50%

N = número de experimentos de réplica realizados,

^a enzima RT de HIV-1 natural en esqueleto de BH10

35 La actividad relativa de los agentes de prueba y comparación contra los diferentes virus se pueden observar de los

datos de resistencia en número de veces presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	Cambio en número de veces			
	W.T.	Y181C	K103N	Y181C/K103N
I	1	1,6 ± 0,7	3,2 ± 3,5	5,0 ± 3,4
III	1	3,2 ± 1,1	1,2 ± 0,4	12,7 ± 4,3
EFV	1	2,3 ± 1,5	34,3 ± 17,5	36,8 ± 20,5

Cambio en número de veces = EC_{50} para el HIV mutante dividido por la EC_{50} para el virus HIV natural.

- 5 El cambio en número de veces promedio se calculó como la media de los cambios en el número de veces individuales probados en paralelo.

Las concentraciones de fármaco calculadas requeridas para bloquear 50% de la enzima (IC_{50}) y los datos mostrados en las Tablas 1-4 se midieron en presencia de detergente (que incrementa el valor de la IC_{50}), sin embargo, generalmente se obtenían valores inferiores en ausencia de detergente.

Actividad antiviral in vitro contra enzimas RT de HIV mutantes adicionales

- 10 Los Compuestos I y III se probaron contra un grupo más amplio de enzimas RT que tienen mutaciones de resistencia a NNRTI comunes. Los datos de eficacia se muestran en la Tabla 3 y los correspondientes cambios en el número de veces se resumen en la Tabla 4. Los estudios se resumen en el texto que sigue.

Tabla 3

Actividad antiviral in vitro contra enzimas RT de HIV-1 con mutación dirigida

Valores de IC_{50} promedio (μM) ± Desviación estándar					
Mutación de RT	N	Comp. I	Comp. III	EFV	
W.T. ^b	10	0,23 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,04 ± 0,006	
L1001 ^c	3	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,06	0,26 ± 0,09	
V106M ^c	3	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,06	0,37 ± 0,07	
V1081 ^c	3	1,20 ± 0,71	0,83 ± 0,35	0,30 ± 0,05	
E138K ^c	3	4,67 ± 0,91	2,99 ± 0,18	0,6 ± 0,16	
M184V ^d	4	0,29 ± 0,08	0,17 ± 0,08	0,02 ± 0,00	
V188L ^c	3	1,25 ± 0,38	1,15 ± 0,36	1,73 ± 0,22	
L1001/K103N ^c	4	0,43 ± 0,33	0,40 ± 0,26	>2	
Intervalo de actividad medio (μM)		0,16-4,67	0,13-2,99	0,02->2	

- 15 IC_{50} = concentración inhibidora que reduce la actividad enzimática en 50%

^a: Número de experimentos repetidos realizador por enzima, excepto cuando se indique otra cosa

^b: Enzima RT de HIV-1 natural en esqueleto de BH10

^c: Enzimas RT derivadas de BH10 con mutaciones de resistencia a fármacos NNRTI dirigidas

^d: Enzima RT derivada de BH10 con mutaciones de resistencia a fármacos NRTI dirigidas

- 20 ^c: 2 conjuntos de datos usados para cálculos de IC_{50}

Como se puede observar a partir de los datos, el Compuesto III y el Compuesto I retenían una eficacia in vitro sustancial contra enzimas RT de HIV con sustituciones en los codones 100, 106, 184 y 134. La única pérdida de eficacia significativa se observaba para mutaciones en los codones 108, 138 y 188.

Tabla 4 Resistencia en número de veces contra un grupo de RT de HIV con mutaciones dirigidas

Cambios medios en número de veces $\pm$ Desviación estándar					
Mutación de	N	Comp. I	Comp. III	EFV	
W.T. ^b	10	1	1	1	
L1001 ^c	3	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 4,0	
V106M ^c	3	1,2 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,3	1 3,4 $\pm$ 8,2	
V1081 ^c	3	4,0 $\pm$ 5,3	3,8 $\pm$ 3,8	3,7 $\pm$ 2,3	
E138K ^c	3	15,5 $\pm$ 6,8	13,7 $\pm$ 1,9	7,6 $\pm$ 7,5	
M184V ^d	4	1,7 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4	
Y188L ^c	3	6,0 $\pm$ 1,7	7,0 $\pm$ 5,9	59,6 $\pm$ 25,8	
L1001/K103N ^c	4	2,4 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 0,8	>101 $\pm$ 43,2	
Intervalo de actividad medio (μ M)		0,5-15,5	0,6-13,7	0,8-101	

Resistencia en número de veces = IC_{50} para la RT de HIV-1 mutante dividida por la IC_{50} para la enzima natural en un ensayo correspondiente.

5 El cambio promedio en número de veces se calculó como las medias de los cambios en número de veces individuales probados en paralelo,

N = número de grupos repetidos de experimentos realizados, excepto cuando se indique por una nota al pie.

^a: Dos grupos de datos usados para el cálculo de la resistencia promedio en número de veces.

Generalmente, los Compuestos I y III daban cambios en número de veces que variaban de 0,5 $\pm$ 0,2 a 15,50 $\pm$ 6,8.

Efecto sobre DNA polimerasas humanas α , β y γ .

10 La RT de HIV, como otra polimerasa viral, comparte una homología estructural limitada con las DNA polimerasas celulares responsables de la síntesis y la reparación de DNA nuclear y mitocondrial normales. Esto origina la posibilidad formal de que los inhibidores de RT de HIV puedan inhibir polimerasas celulares, dando como resultado toxicidad celular. En particular, la inhibición de polimerasa γ tiene el potencial de dar como resultado toxicidad mitocondrial. La capacidad del Compuesto I y el Compuesto III para inhibir DNA polimerasas celulares se evaluó

15 usando ensayos in vitro estándar (Tabla 5).

Cuando se probaban in vitro, el Compuesto III, el Compuesto I y el EFV no alcanzaban una IC_{50} con DNA polimerasa celular humana α o β a concentraciones que variaban de 100->450 μ M. De forma similar, los datos preliminares (n = 1) mostraban que las IC_{50} del Compuesto I y el EFV eran >100 μ M contra la actividad de DNA polimerasa γ humana in vitro, mientras que el Compuesto III tenía una IC_{50} de 60,1 μ M contra esta enzima.

20

Tabla 5

Actividad in vitro contra polimerasas dependientes de DNA celulares humanas α , β y γ

Compuesto	N	Valores promedio de IC ₅₀ (μ M) $\pm$ Desviación estándar		
		DNA Pol α^a	DNA Pol β^b	DNA Pol γ^c
I	4/4/1	145,7 $\pm$ 4 4,5	$\geq 422,2 \pm 149,6$	118,5
III	4/4/1	159,3 $\pm$ 8 4,3	$\geq 479,0 \pm 41,9$	60,1
EFV	4/4/1	108,6 $\pm$ 4 0,9	314,2 $\pm$ 177,2	116,3
Act. D	4/4/1	16,1 $\pm$ 1 1,2	23,0 $\pm$ 10,4	16,9

IC₅₀ = concentración eficaz que inhibe la actividad enzimática en 50% in vitro.

N = número de experimentos repetidos realizados para cada polimerasa

5 Act. D = actinomicina D usada como un control de ensayo positivo

^a: DNA polimerasa humana α

^b: DNA polimerasa humana β

^c: DNA polimerasa humana γ ; datos preliminares procedentes de un solo experimento

Demostración directa de la unión a RT de HIV

10 Se realizó la determinación estructural de la RT de HIV mutante doble K103N/Y181C (la misma enzima de la cepa BH-10 usada en los ensayos de actividad) cocristalizada con los Compuestos I y III.

Los NNRTI habitualmente son pequeños y tienen fuerte afinidad para un bolsillo hidrófobo situado cerca del sitio catalítico de la RT. La unión del inhibidor restringe la flexibilidad de la enzima e interfiere con la síntesis de DNA apropiada (Clavel y Hance, HIV drug resistance. N Engl J Med; 350:1023-35 (2004)).

15 Se realizó la cristalización de proteína mutante K103N/Y181C en presencia de Compuesto I. Proteína de RT K103N/Y181C de HIV-1 recombinante se concentró en presencia de Compuesto I, y a continuación se usó en experimentos sucesivos de microsiembra de cristales para dar cristales de proteína de tamaño suficiente para permitir la recogida de datos de rayos X. Se usó un solo cristal para la difracción de rayos X y el modelado. A 3 Å, el esquema muestra el Compuesto I unido al bolsillo de NNRTI de RT de HIV-1.

20 La estructura cristalina por rayos X del Compuesto I en un cocomplejo con enzima mutante doble de HIV-1 K103N/Y181C enzimáticamente activa se muestra en la Figura 1A y un esquema se muestra en la Figura 1B. La estructura muestra el Compuesto I que se une al bolsillo de NNRTI en RT de HIV, de un modo similar al fármaco aprobado efavirenz (Bacheler, et al., J Virol; 75:4999-5008 (2001)). El anillo indólico del Compuesto I se puede observar en estrecha proximidad a los codones 101 y 103 de RT de HIV-1.

25 Actividad celular

Esta sección resume los perfiles de actividad antiviral del Compuesto I y el Compuesto III contra HIV-1 y HIV-2 en sistemas de cultivo celular. Estas actividades se midieron con una amplia variedad de ensayos y puntos finales, usando múltiples cepas de HIV y tipos de células humanas que soportan la replicación de HIV.

Ejemplo 13

30 Actividad contra la cepa BH10 de HIV-1

El ensayo basado en células para HIV estándar empleado es un ensayo de 4 días en células MT-4 con una lectura por ELISA de p24. La actividad anti-HIV-1 in vitro (valor de EC₅₀) de IDX12899 se determinó en un ensayo de sensibilidad a fármacos (DSA) basado en células estándar esencialmente como el descrito en Devine D, Mathews N, Kinchington D (2000), Antiviral Meth and Prot. Human Press Inc., Totowa, NJ. 185-199. El virus de prueba HIV-1 es del origen de la cepa BH10 subtipo B. El grupo de prueba estándar incluía virus natural, así como derivados de mutación dirigida Y181C, K103N y K103N/Y181C. Los datos procedentes de este ensayo se resumen en la Tabla 6 posteriormente. Contra el virus BH10 natural, las actividades inhibitoras del Compuesto I y el Compuesto III y el EFV eran todas muy similares con EC₅₀ alrededor de 1 nM. Los valores de control estaban muy de acuerdo con resultados previamente publicados (Young et al., 1995, Antimicrob Agents Chemother: 39(12):2602-5; Andries et al., 2004, Antimicrob Agents Chemother; 48(12):4680-6; Janssen et al., 2004, J Med Chem; 48(6): 1901-9; Boone 2006, Curr. Opin Investig Drugs; 7(2): 128-35) y los obtenidos utilizando el ensayo FenoScreen™.

Tabla 6

Valores de IC ₅₀ Medios (μM) ± Desviación Estándar				
Compuesto	N	DNA Pol α ^a	DNA Pol β ^b	DNA Pol γ ^c
I	4	145,7 ± 44,5	422,2 ± 149,6	118,5
II	4	159,3 ± 84,3	≥479,0 ± 41,9	≥95,2 ± 9,5
EFV	4	108,5 ± 4 0,9	314,2 ± 177,2	≥100
Act. D	4	16,1±1 1,2	23,0 ± 1 0,4	11,8±1,9
ddCTP	4	N/A	N/A	1,5 ± 0,6

IC₅₀ = concentración eficaz que inhibe la actividad enzimática en 50% in vitro.

N = número de experimentos repetidos realizado para cada polimerasa

Act. D = actinomicina D usada como un inhibidor de control de ensayo positivo

5 ddCTP = trifosfato de didesoxicitidina usado como un inhibidor de control positivo en el ensayo de DNA pol γ

N/A = no aplicable

^a: DNA polimerasa α humana

^b: DNA polimerasa β humana

^c: DNA polimerasa γ humana

10 ^d: precipitados visibles observados

Contra los virus mutantes, el EFV exhibía el perfil antiviral esperado; inhibía eficazmente el crecimiento del virus Y181C (EC₅₀ = 2,5 nM) pero era significativamente menos activo contra los virus mutantes K103N o Y181C/K103N (valores de EC₅₀ medios de 41 a 42 nM).

15 Las actividades de los diferentes artículos de prueba contra los virus mutantes son evidentes a partir de los correspondientes valores de resistencia en número de veces resumidos en la Tabla 7. Los 5 compuestos mostraban una actividad disminuida de forma similar contra el mutante Y181C (los desplazamientos en número de veces medio variaban de 2,3 a 3,7). Mientras que el EFV mostraba un cambio medio de 34,3 veces contra el virus K103N, los restantes compuestos mostraban una actividad esencialmente inalterada (0,8-1,2 veces)

Tabla 7 Resistencia en número de veces de los Compuestos contra virus HIV-1 BH10

Compuesto	Cambio en número de veces			
	W.T.	Y181C	K103N	K103N/Y181C
Comp. I	1	3,4 ± 1,7	0,9 ± 0,4	4,5 ± 2,5
Comp. III	1	3,2 ± 1,1	1,2 ± 0,4	12,7 ± 4,3
EFV	1	2,3 ± 1,5	34,3 ± 1 7,5	36,8 ± 2 0,5

20 Cambio en número de veces = EC₅₀ para el HIV mutante dividida por la EC₅₀ para el virus HIV natural. El cambio en número de veces promedio se calculó como la media de los cambios en el número de veces individuales probados en paralelo.

25 La actividad de los compuestos también se evaluó con el mismo virus y tipo de célula usando una lectura de ensayo diferente basada en el efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés). Este ensayo mide la viabilidad celular después de la infección por HIV-1 en vez de la producción de proteína de la cápsida y también difiere del ensayo estándar en cuanto a la disposición y la ejecución del ensayo y de ahí que proporcione una corroboración útil de los resultados obtenidos mediante el último método. Los datos procedentes de 5 experimentos independientes se resumen en la Tabla 8 posteriormente.

Tabla 8 Actividad contra virus HIV-1 BH10 en un ensayo de células MT-4 mediante el CPE

Compuesto	N ^a	Valores de EC ₅₀ promedio (μM) ± Desviación estándar			
		W.T. ^b	Y181C ^b	K103N ^b	K103N/Y181C ^b
Comp. I	5	0,0003 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0003	0,0003 ± 0,0001	0,0035 ± 0,0015
Comp. III	5	0,0002 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0006	0,0001 ± 0,0001	0,0066 ± 0,0010
EFV	5	0,0006 ± 0,0001	0,0016 ± 0,0001	0,0410 ± 0,0130	0,0530 ± 0,0120

^a = número de experimentos repetidos realizado.

^b = Virus BH10 natural y con mutación dirigida.

Tabla 9 Resistencia en número de veces

Compuesto	Cambio en número de veces			
	W.T.	Y181C	K103N	K103N/Y181C
Comp. I	1	6,5 ± 0,9	1,0 ± 0,3	12,7 ± 5,0
Comp. III	1	11,9 ± 4,7	1,1 ± 0,3	55,6 ± 21,8
EFV	1	2,7 ± 0,7	66,8 ± 14,8	88,0 ± 20,5

- 5 Cambio en el número de veces = EC₅₀ para el HIV mutante dividida por la EC₅₀ para el virus HIV natural.

El cambio en número de veces promedio se calculó como la media de los cambios en número de veces individuales probados en paralelo.

En el ensayo de CPE, la replicación del virus BH10 natural era potentemente inhibida por el Compuesto I, el Compuesto III y EFV como se muestra por los valores medios de EC₅₀ subnanomolares (intervalo de 0,1 a 0,7 nM).

- 10 Los virus del grupo BH10 Y181C, K103N y K103N/Y181C eran inhibidos eficazmente por el Compuesto I, el Compuesto III, con valores medios de EC₅₀ que variaban de 0,1 a un máximo de 6,6 nM. Como se esperaba, el EFV inhibía eficazmente el crecimiento del virus Y181C pero era bastante menos activo contra los otros virus mutantes (valores de EC₅₀ de 41 a 53 nM). Los valores de control estaban muy de acuerdo con resultados descritos previamente (Young et al., 1995, *Antimicrob Agents Chemother*; 39(12):2602-5; Andries et al., 2004, *Antimicrob Agents Chemother*; 48(12):4680-6; Janssen et al., 2004, *J Med Chem*; 48(6):1901-9; Boone 2006, *Curr. Opin Investig Drugs*; 7(2): 128-35).

- 20 En cuanto a los cambios en número de veces en comparación con la cepa WT de BH10, el Compuesto I, el Compuesto III y el EFV mostraban un intervalo en número de veces de 2,7 a 11,9 de incremento contra el mutante Y181C, mientras que el Compuesto I y el Compuesto III no mostraban cambio (<1,8 veces) contra el mutante K103N. El mutante K103N/Y181C daba mayor variabilidad y cambios en número de veces de 12,7 (Compuesto I) y 55,6 (Compuesto III). El EFV mostraba desplazamientos en número de veces medios respectivos de 66,8 y 88,0 contra los mutantes K103N y K103N/Y181C, respectivamente.

Actividad contra la cepa NL4-3 de HIV-1

- 25 Las actividades del Compuesto I y el Compuesto III también se determinaron en un ensayo basado en células que empleaba virus HIV-1 subtipo B con un esqueleto de NL4-3. El grupo estándar de virus NL4-3 (w. t., Y181C, K103N y K103N/Y181C) se ensayó como con los compuestos de prueba como se describe para el grupo de virus BH-10 anterior usando la lectura por ELISA. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 10.

- 30 Los resultados de este estudio generalmente son comparables con los observados con los virus BH10. En los antecedentes de NL4-3, los compuestos son potentes contra el virus NL4-3 w. t. (las EC₅₀ variaban de 0,7 a 2,3 nM) y el virus Y181C (las EC₅₀ variaban de 0,7 a 2,3 nM).

Tabla 10 Actividad contra virus HIV-1 NL4-3 en un ensayo de células MT-4

Compuesto	N ^a	Valores promedio de EC ₅₀ (μM) ± Desviación estándar			
		W. T. ^b	Y181C ^b	K103N ^b	K103N/Y181C ^b
Comp. I	5	0,0020 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0016	0,0014 ± 0,0004	0,0028 ± 0,0008

Compuesto	N ^a	Valores promedio de EC ₅₀ (μM) ± Desviación estándar			
		W. T. ^b	Y181C ^b	K103N ^b	K103N/Y181C ^b
Comp. III	5	0,0017 ± 0,0003	0,0036 ± 0,0020	0,0015 ± 0,0003	0,0065 ± 0,0023
EFV	5	0,0023 ± 0,0002	0,0057 ± 0,0019	0,0612 ± 0,0338	0,0619 ± 0,0183

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en un cultivo celular.

^a N = número de experimentos repetidos realizado.

^b Virus BH10 natural y con mutación dirigida adaptados al laboratorio.

Tabla 11 Resistencia en número de veces

Compuesto	Cambio en número de veces			
	W.T.	Y181C	K103N	K103N/Y181C
Comp. I	1	2,0 ± 0,8	0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,4
Comp. III	1	2,1 ± 1,1	0,9 ± 0,2	3,9 ± 1,7
EFV	1	2,5 ± 0,7	34,6 ± 7,8	27,4 ± 8,6

5 Cambio en número de veces = EC₅₀ para el HIV mutante dividido por la EC₅₀ para el virus HIV natural.

El cambio en número de veces promedio se calculó como la media de los cambios en número de veces individuales en paralelo.

Actividad contra aislados clínicos de HIV-1 en células MT-2

10 La eficacia clínica del Compuesto I y el Compuesto III se midió posteriormente contra dos aislados clínicos de HIV-1 adaptados a la línea celular MT-2 junto con los fármacos de comparación. El grupo de prueba de virus consistía en mutantes de aislados clínicos que expresaban Y181C (nº 3350) y K103N/Y181C (nº 5054) en comparación con un virus WT sensible. Los datos se resumen en la Tabla 12 posteriormente.

Tabla 12 Actividad contra aislados clínicos de HIV-1 en un ensayo con células MT-2

Compuesto	N	Valores promedio de EC ₅₀ (μM) ± Desviación estándar		
		W.T. (BH10) ^a	Y181C ^b	K103N/Y181C ^c
Comp. I	5	0,0009 ± 0,0006	0,0014 ± 0,0006	0,0020 ± 0,0003 i
Comp. III	5	0,0011 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0005	0,0057 ± 0,0035
EFV	5	0,0008 ± 0,0002	0,0018 ± 0,0003	0,0724 ± 0,0217

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

15 ^a Cepa natural adaptada para laboratorio.

^b El aislado clínico 3350 es resistente a Nevirapine. Este mutante también posee una mutación M184V.

^c Aislado clínico 5054.

Tabla 13 Resistencia en número de veces

Compuesto	Cambio en número de veces		
	W.T.	Y181C	K103N/Y181C
Comp. I	1	2,2 ± 1,3	3,2 ± 2,1
Comp. III	1	1,7 ± 0,9	6,2 ± 4,3
EFV	1	2,2 ± 0,6	93,1 ± 31,4

Cambio en número de veces = EC₅₀ para el HIV mutante dividida por la EC₅₀ para el HIV natural.

Nótese que el cambio en número de veces no se determinaba a partir de los valores medios de EC₅₀ de la Tabla 12, sino que se calculaba en primer lugar para experimentos individuales. A continuación, se tomó el cambio en número de veces medio +/- DE de todos los experimentos.

Actividad contra cepas de HIV-1 en PBMC humanas

- 5 La actividad antiviral del Compuesto I y el Compuesto III y las comparaciones se midió posteriormente contra un grupo de HIV-1 en células mononucleocíticas de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). El grupo de virus completo consistía en 3 mutantes de aislados clínicos que expresaban virus K103N (nº 4937 y nº 5002) y K103N/Y181C (nº 5004), junto con dos virus WT sensibles a NNRTI (BH10 y NL4-3). Los resultados de cinco conjuntos de datos independientes se resumen en la Tabla 14.

10 Tabla 14

Actividad contra virus HIV-1 en un ensayo con células PBMC

Compuesto	Valores promedio de EC ₅₀ (µM) ± Desviación estándar			
	W. T. (BH10) ^a	W. T. (NL4-3) ^a	K103N ^b	K103N/Y181C ^c
Comp. I	0,0004 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0007	0,0007 ± 0,0003	0,0027 ± 0,0016
Comp. III	0,0004 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0005	0,0009 ± 0,0004	0,0088 ± 0,0044
EFV	0,0009 ± 0,0003	0,0021 ± 0,0007	0,0414 ± 0,0369	0,0687 ± 0,0487

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

Los números representan valores medios +/- desviación estándar derivados de 5 experimentos independientes.

^a Cepa de virus natural adaptada al laboratorio.

- 15 ^b Resultados aislados clínicos usados 4937 (n=3) y 5002 (n=2).

^c Aislado clínico 5004.

- 20 Los 5 compuestos eran extremadamente potentes contra el virus BH10 wt en PBMC, con valores de EC₅₀ de 0,4 a 0,9 nM. Típicamente, los agentes eran de 2 a 4 veces menos eficaces contra el virus NL4-3 en las mismas células. El Compuesto I y el Compuesto III inhibían la replicación de los virus K103N eficazmente, con una pérdida de solo 1 a 2 veces de actividad (frente al virus BH10), pero eran menos de 6 a 22 veces menos inhibidores para el aislado de K103N/Y181C. En contraste, el EFV exhibía cerca de 40 a 70 veces menos actividad contra los aislados de mutantes simples y dobles, respectivamente. Los valores de los artículos de control y de prueba estaban muy de acuerdo con resultados previamente publicados (Young et al., 1995, Antimicrob Agents Chemother: 39(12):2602-5; Andries et al., 2004, Antimicrob Agents Chemother; 48(12):4680-6; Janssen et al., 2004, J Med Chem; 48(6): 190 1-9) y con otros valores presentados en esta sección.

Actividad contra virus HIV-1 IIIB en células MT-4 mediante un ensayo de CPE

- 30 Posteriormente, los artículos de prueba se caracterizaron contra un grupo de mutantes cultivados en laboratorio de HIV-1 IIIB como se resume en el texto posterior. La eficacia antiviral se determinó a través de un ensayo de CPE con una lectura de MTS para la viabilidad celular. Los virus probados en este ensayo incluían el IIIB w. t. estándar, así como virus Y181C y Y181C/K103N seleccionados en cultivo, pero el K103N habitual se reemplazó por un mutante triple K103R/V179D/P225H seleccionado que se describe más adelante. Los datos de eficacia promedio se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15 Actividad contra virus HIV-1 IIIB en células MT-4 por CPE

Compuesto	N ^a	Valores promedio de EC ₅₀ (µM) ± Desviación estándar			
		W.T. ^b	Y181C ^b	K103R/V179D/P225H ^b	K103N/Y181C ^b
Comp. I	5	0,0010 ± 0,0004	0,0028 ± 0,0003	0,0100 ± 0,0015	0,0047 ± 0,0009
Comp. III	5	0,0005 ± 0,0001	0,0021 ± 0,0003	0,0250 ± 0,0060	0,0091 ± 0,0019
EFV	5	0,0015 ± 0,0006	0,0069 ± 0,0020	> 1,0	0,1120 ± 0,0330

^a = número de experimentos repetidos realizado.

- 35 ^b = Virus BH10 natural y con mutación dirigida adaptados al laboratorio.

Tabla 16 Resistencia en número de veces

Compuesto	Cambio en número de veces			
	W.T.	Y181C	K103R/V179D/P225H	K103N/Y181C
Comp. I	1	2,9 ± 0,8	11,1 ± 4,1	4,8 ± 1,6
Comp. III	1	4,5 ± 1,0	53,5 ± 12,8	19,5 ± 4,3
EFV	1	4,6 ± 0,5	>711,7 ± 255,3	74,2 ± 17,2

Cambio en número de veces = EC_{50} para el HIV mutante dividido por la EC_{50} para el virus HIV natural.

El cambio en número de veces promedio se calculó como la media de los cambios en número de veces individuales en paralelo.

- 5 El virus IIB W. T. era inhibido eficazmente por los 5 fármacos con valores medios de EC_{50} (en μM) que variaban de $0,0004 \pm 0,0002$ a $0,0017 \pm 0,0004$.

La replicación del virus IIB Y181C seleccionado por cultivo también era inhibida eficazmente por cada fármaco con valores medios de EC_{50} (en μM) que variaban de $0,0021 \pm 0,0003$ a $0,0120 \pm 0,0026$. Estos valores están muy de acuerdo con otros resultados presentados a lo largo de esta sección.

- 10 El virus IIB K103N/Y181C generalmente era inhibido eficazmente por el Compuesto I y Compuesto III como está implícito en los valores medios de EC_{50} (en μM) que varían de $0,0026 \pm 0,0004$ a $0,0099 \pm 0,0016$. sin embargo, el EFV era mucho menos eficaz como se observaba por el valor medio de EC_{50} (en μM) de $0,1120 \pm 0,0330$.

- 15 El virus IIB mutante triple K103R/V179D/P225H mostraba resultados más variables y una resistencia mucho mayor a EFV, aunque seguía siendo relativamente sensible al Compuesto I y el Compuesto III. Los valores medios de EC_{50} (en μM) eran: $0,0100 \pm 0,0015$ (Compuesto I), $0,0250 \pm 0,0060$ (Compuesto III) y $> 1,0$ (EFV). Nótese que una enzima RT mutante K103R no es resistente a NNRTI (datos no mostrados).

- 20 En cuanto a los cambios en número de veces en la sensibilidad a los fármacos para el grupo de mutantes de IIB, los valores medios de resistencia en número de veces para el Compuesto I, el Compuesto III y el EFV generalmente se cambiaban poco ($2,9 \pm 0,8$ a $7,7 \pm 2,8$ veces) contra el virus Y181C. La resistencia en número de veces contra el mutante K103N/Y181C era más variable pero dentro del intervalo de cambios observado en esta sección en general: los cambios en número de veces eran $4,8 \pm 1,6$ (Compuesto I) $19,5 \pm 4,3$ (Compuesto III). Los valores medios de resistencia en número de veces observados para el mutante K103R/V179D/P225H eran: $11,1 \pm 4,1$ (Compuesto I), $53,5 \pm 12,8$ (Compuesto III) y $>711,7 \pm 255,3$ (EFV).

- 25 En resumen, estas pruebas en el ensayo de CPR de virus IIB generalmente confirman los hallazgos presentados en cualquier parte de esta sección, con la excepción del virus mutante triple K103R/V179D/P225H. El Compuesto I era el más activo contra este mutante ($EC_{50} = 10$ nM), seguido por el Compuesto III con actividad razonable ($EC_{50} = 21$ a 25 nM), mientras que el EFV era esencialmente inactivo ($EC_{50} > 1.000$ nM). Aunque el patrón genotípico del mutante K103R/V179D/P225H no se reconoce comúnmente en muestras clínicas, se sabe que la combinación de K103R/V179D confiere grandes reducciones en la sensibilidad a los tres NNRTI aprobados (Harrigan et al., 2005, AIDS; 19:549-54; Parkin et al., 2006, Antimicrob Agents Chemother; 50(1):351-4).

Actividad contra diversas cepas de HIV-1 en diferentes líneas celulares humanas

- 35 El virus y la dependencia de la célula huésped del Compuesto I, el Compuesto III y fármacos de control se examinó adicionalmente en ensayos de sensibilidad a fármacos realizados a través de 3 cepas de HIV-1 naturales subtipo B diferentes y 5 líneas celulares diferentes. Las cepas de HIV-1 usadas eran BH10, NL4-3 y IIB; las líneas celulares eran células U-937 (monocitos humanos derivados de un linfoma histiocítico); células MOLT-4 (una línea celular de leucemia linfoblástica T humana); células H-9 (células T linfoblásticas humanas) y células T de leucemia humana MT-2 y MT-4.

- 40 Los valores medios de EC_{50} y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes se resumen en la Tabla 17. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, el Compuesto I, el Compuesto III y el EFV retenían potencias muy inalteradas a través de cada combinación de virus natural y célula huésped probada. Las actividades observadas variaban de $0,4$ a $3,2$ nM.

Tabla 17 Actividad contra cepas de HIV-1 W.T. en líneas de células huésped humanas establecidas

Valores promedio de EC ₅₀ (μM) ± Desviación estándar				
Huésped	Virus	Comp. I	Comp. III	EFV
U937	IIIB	0,0005 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0008
MOLT-4	IIIB	0,0007 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0002
H9	IIIB	0,0006 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0002	0,0015 ± 0,0006
U937	BH10	0,0006 ± 0,0002	0,0013 ± 0,0006	0,0019 ± 0,0008
MT-2	BH10	0,0009 ± 0,0006	0,0011 ± 0,0004	0,0008 ± 0,0002
MT-4	BH10	0,0010 ± 0,0004	0,0012 ± 0,0006	0,0012 ± 0,0008
MT-4	NL4-3	0,0020 ± 0,0001	0,0017 ± 0,0003	0,0023 ± 0,0002
Intervalo de actividad media (μM)		0,0005 ± 0,0020	0,0005 ± 0,0017	0,0008 ± 0,0023

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular. Los números representan valores medios +/- desviación estándar derivados de 3 experimentos independientes.

- 5 Los intervalos de actividad media observados para cada uno de los fármacos a través de cada uno de las cepas de virus y los tipos de célula se resumen en la última fila de la tabla. El Compuesto I y el Compuesto III presentaban una potente actividad antiviral in vitro (intervalo de 0,5 a 2 nM) a través de las tres cepas de HIV-1 y las líneas celulares de células T y monocíticas humanas morfológicamente distintas. Los 5 compuestos mostraban una actividad bastante comparable.

Actividad contra un grupo de diferentes subtipos de HIV-1

- 10 Las actividades de los compuestos de prueba y control se probaron posteriormente contra un grupo de subtipos que cubre todos los subtipos o clases principales de HIV-1 (A, B, C, D, F1, G, H, AE y AG). Este grupo era parte de un grupo de 64 virus seleccionado de la gran biblioteca de aislados clínicos Monogram BioSciences (previamente ViroLogics). Cada uno de los subtipos del grupo estaba representado por 2 virus distintos que comparten muchas similitudes de secuencia, pero también algunas diferencia clave y por lo tanto podrían responder de forma diferente
- 15 a uno o más de los fármacos incluidos en este estudio.

A partir de la prueba FenoSense™ de los artículos de prueba Compuesto I, Compuesto III y el fármaco de control EFV, las actividades del compuesto I, el compuesto III y el EFV contra un grupo de subtipos (18 virus) que comprendía 9 subtipos de HIV-1 diferentes (A, B, C, D, F1, G, H, AE, AG) estaban todas dentro de 2 veces los valores de actividad para el tipo natural (datos no mostrados).

- 20 Entre los diferentes subtipos, los intervalos de potencia global eran: Compuesto I, de 0,25 a 3,20 nM; Compuesto III = de 0,2 a 2,14 nM; EFV = de 0,40 a 3,10 nM. De forma no sorprendente, el intervalo de potencia era algo mayor a través de los subtipos (de 10 a 11 veces) que dentro de los subtipos, pero esta variabilidad se debía principalmente solo a dos aislados de virus: el segundo aislado de HIV-1 subtipo C era, de manera general, el menos sensible a todos los fármacos probados; a la inversa, los dos aislados subtipo H parecían altamente sensibles a todos los fármacos (valores de EC₅₀ de 0,17 a 0,55 nM). Sin embargo, estos virus también tenían una capacidad de replicación reducida de 42% y 10%, respectivamente, lo que podría contribuir a su aparente hipersensibilidad. Los virus de los subtipos restante generalmente mostraban una divergencia de < 2,5 veces en la potencia con respecto a la cepa de referencia CNDO.
- 25

Actividad contra HIV-2 ROD en células H9

- 30 La sensibilidad de HIV tipo 2 ROD en células H9 al Compuesto I y al Compuesto III se determinó contra zidovudina (AZT) como un control. Los datos promediados se derivaban de dos experimentos de actividad antiviral independientes y se muestran en la Tabla 18.

- El Compuesto I y el Compuesto III fallaban en la supresión de la replicación de HIV-2 ROD a la concentración más alta ensayada (1,25 μM), mientras que el control de AZT desplegaba una actividad (0,1619 ± 0,0767 μM) comparable a los valores publicados (Witvrouw, et al 2004, Antiviral Therapy 9:57-65).
- 35

Tabla 18 Actividad contra HIV-2 ROD WT en un ensayo de células H9

Compuesto	Valores de EC ₅₀ (μM)
Compuesto I	> 1,25
Compuesto III	> 1,25
AZT	0,1619 ± 0,0767

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

Los números representan valores medios +/- desviación estándar procedentes de 2 experimentos independientes.

Actividad contra HIV-1 en presencia de suero humano y glicoproteína ácida α-1

- 5 Los estudios previos medían típicamente la EC₅₀ de cada fármaco contra el crecimiento de HIV-1 en cultivo celular en presencia de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 10%. Para estimar una EC₅₀ ajustada al suero para los artículos de prueba, se realizaron experimentos adicionales en presencia de suero humano al 45% o 1 mg/ml de glicoproteína ácida α-1 o ambos. Los resultados promediados de 3 a 7 experimentos de actividad antiviral se muestran en la Tabla 19.

10 Tabla 19 Actividad anti-HIV-1 BH10 W.T. en presencia de HS o AAG

Compuesto	N	Valores promedio de EC ₅₀ (μM) ± Desviación estándar			
		Suero Bovino Fetal al 10%	Suero Bovino Fetal al 10% + AAG ^a	Suero Humano al 45% ^b	Suero Humano al 45% + AAG
Comp. I	5	0,0011 ± 0,0004	0,0029 ± 0,0012	0,0146 ± 0,0063	0,0190 ± 0,0017
Comp. III	5	0,0012 ± 0,0004	0,0028 ± 0,0004	0,0219 ± 0,0117	0,0326 ± 0,0073
EFV	7	0,0016 ± 0,0005	0,0050 ± 0,0023	0,0115 ± 0,0039	0,0116 ± 0,0074

EC₅₀ = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

^a glicoproteína ácida α-1 en 1 mg/ml.

^b Suero humano - AB carece de los anticuerpos contra los antígenos de los tipos sanguíneos A y B.

Tabla 20 Resistencia en número de veces

Compuesto	N	Cambio en número de veces			
		Suero Bovino Fetal al 10%	Suero Bovino Fetal al 10% + AAG ^a	Suero Humano al 45% ^b	Suero Humano al 45% + AAG
Comp. I	5	1	2,7 ± 0,7	1 5,9 ± 1 1,1	1 9,5 ± 7,6
Comp. III	5	1	2,1 ± 0,5	1 7,0 ± 6,3	2 4,8 ± 3,8
EFV	7	1	2,4 ± 0,8	8,4 ± 3,2	5,4 ± 3,2

- 15 Cambio en número de veces = EC₅₀ obtenida con suero bovino fetal + AAG o suero humano +/- AAG dividida por la EC₅₀ obtenida con suero bovino fetal solo. Nótese que el cambio en número de veces no se determinaba a partir de los valores medios de EC₅₀ de la Tabla 19, sino que se calculaba en primer lugar para experimentos individuales. A continuación, se tomó el cambio en número de veces medio +/- la desviación estándar de todos los experimentos.

^a glicoproteína ácida α-1 en 1 mg/ml.

- 20 Los 5 fármacos inhibían la replicación de virus WT en presencia de FBS al 10% con las potencias anticipadas, con valores de EC₅₀ que variaban de 1,0 a 1,6 nM. La adición de 1 mg/ml de AAG generalmente disminuía la potencia del fármaco en de 2 a 3 veces para cada fármaco, desplazando los valores medios de EC₅₀ hasta el intervalo de 2 a 5 nM.

- 25 Las potencias de los 5 fármacos se reducían hasta un nivel mayor mediante suero humano (HS, por sus siglas en inglés) al 45%, conduciendo a valores medios de EC₅₀ de 11,5 a 21,9 nM y desplazamientos en número de veces de 8,4 a 17,0 veces. La presencia de HS al 45% + AAG en experimentos de cultivo daba resultados más variables y

valores medios de EC_{50} (en nM) de 19,0 (Compuesto I), 32,6 (Compuesto III) y 11,6 (EFV). Los valores observados para los controles estaban muy de acuerdo con resultados publicados (Young et al., 1995, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(12):2602-5; Andries et al., 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(12):4680-6; Janssen et al., 2004, *J. Med. Chem.*; 48(6): 1901-9; Boone 2006, *Curr. Opin Investig Drugs*; 7(2): 128-35). Los correspondientes cambios medios en número de veces eran 19,5 (Compuesto I), 24,8 (Compuesto III) y 5,4 (EFV).

En resumen, no se observaba una interacción de unión a proteínas significativa con AAG sola (cambio <3 veces) para el Compuesto I y el Compuesto III. Se estimaba una elevación moderada de EC_{50} (cambio de 16 a 25 veces) en HS o HS + AAG. En general, los datos sugieren que la unión a proteína es un poco superior para el Compuesto I y el Compuesto III que para el EFV.

Ejemplo 14

Citotoxicidad in vitro

Se usaron ensayos basados en células convencionales que usan células proliferativas para evaluar la citotoxicidad del Compuesto I y el Compuesto III. Estos estudios de citotoxicidad de 3 a 12 días se enfocan en líneas celulares humanas que bien (i) son sensibles a infección con virus HIV-1 in vitro (p. ej. monocitos sanguíneos primarios; células de leucemia MT-2 y MT-4) o bien (ii) se usan comúnmente para evaluar citotoxicidad in vitro inducida por fármacos (p. ej. HepG2, HuH7 o HeLa) (Divi RL, Haverkos KJ, Hums JA, et al (2006) Morphological and molecular course of mitochondrial pathology in cultured human cells exposed long-term to zidovudine. *Environ Mol Mutagen*; 47). La viabilidad celular se midió mediante tinción estándar con MTT o MTS.

Efecto citotóxico en células PBMC

La citotoxicidad in vitro de los artículos de prueba se evaluó en 4 experimentos independientes en células mononucleares sanguíneas primarias (PBMC) humanas. Las PBMC se expusieron al Compuesto I y al Compuesto III junto con el fármaco de control EFV durante 3 días a concentraciones que variaban de 0,005 μ M a 100 μ M. La viabilidad celular se determinó a través de tinción con MTT. Los resultados se presentan como las concentraciones eficaces medias de fármaco que reducían la viabilidad celular en 50% (CC_{50}).

Los valores medios de CC_{50} (en μ M) determinados para los artículos de prueba en PBMC eran: Compuesto I = $52,6 \pm 15,2$ y Compuesto III = $66,9 \pm 19,6$. Para el artículo de control el valor medio de CC_{50} (en μ M) determinado era: EFV = $70,9 \pm 7,6$.

Citotoxicidad celular en células huésped humanas para HIV-1

Los efectos citopáticos in vitro de los artículos de prueba Compuesto I y Compuesto III y el fármaco de control EFV se probaron posteriormente en las seis líneas de células huésped humanas sensibles a HIV-1 siguientes: células U-937 (monocitos humanos derivados de un linfoma histiocítico); células MOLT-4 (una línea celular de leucemia linfoblástica T humana); células H9 (células T linfoblásticas humanas); células IM9 (una línea de células linfoblásticas B humana); y células T de leucemia humana MT-2 MT-4.

Después de la exposición al fármaco durante 4 días, la viabilidad celular se midió mediante tinción con MTS y se determinaron los valores de CC_{50} . Las concentraciones de fármaco variaban de 0,005 μ M a 100 μ M. Los resultados de 3 experimentos independientes (a menos que se indique otra cosa) se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21

Citotoxicidad celular en líneas de células huésped humanas para HIV-1

Compuesto	Valores promedio de CC_{50} (μ M) $\pm$ Desviación estándar ^{a, b}						Intervalo medio de CC_{50} (μ M)
	U937 ^d	MOLT-4 ^e	H9 ^f	IM9 ^g	MT-2 ^h	MT-4 ^h	
I	$26,5 \pm 0,5$	$16,6 \pm 0,4$	$20,0 \pm 1,6$	$32,9 \pm 2,6$	$23,5 \pm 1,0$	$18,6 \pm 3,1$	16,6-32,9
III	$24,6 \pm 1,9$	$14,8 \pm 1,0$	$31,3 \pm 5,2$	$50,0 \pm 17,4$	$25,9 \pm 2,1$	$27,3 \pm 12,9$	14,8-50,0
EFV	$23,2 \pm 1,0$	$41,7 \pm 3,4$	$50,0 \pm 9,0$	$51,0 \pm 1,3$	$24,6 \pm 4,5$	$44,1 \pm 18,2$	23,2-51,0

^a CC_{50} = concentración eficaz que reduce la viabilidad celular en 50%.

^b Los números representan valores medios $\pm$ desviación estándar derivados de 3 experimentos independientes a menos que se indique otra cosa.

^c Los valores de derivaban de 2 experimentos independientes.

^d Linfoma histiocítico de monocitos humano: cultivado en placa en 5×10^3 células por pocillo.

^e Leucemia linfoblástica T humana: cultivada en placa en 2×10^4 células por pocillo.

^f Linfoma de células T linfoblástico humano: cultivado en placa en 4×10^4 células por pocillo.

^g Línea celular linfoblastoide B humana: cultivada en placa en 2×10^4 células por pocillo.

5 ^h Leucemia de células T humana: cultivada en placa en $1,25 \times 10^4$ (MT-2) y $2,5 \times 10^4$ (MT-4) células por pocillo.

Los artículos de prueba Compuesto I y Compuesto III y los compuestos de control exhibían una citotoxicidad in vitro medible en las 6 líneas de células huésped sensibles a HIV-1 humanas. Dependiendo del tipo de célula, los valores medios de CC_{50} para el Compuesto I variaban de 16,6 a 32,9 μM frente a de 14,8 a 50,0 μM para el Compuesto III (Tabla 21), similares a los intervalos medios de CC_{50} determinados para EFV (de 23,2 a 51,0 μM).

10 Entre las 6 líneas celulares, la línea celular MOLT-4 era la más sensible a la citotoxicidad por el Compuesto I y el Compuesto III. El EFV mostraba la mayor citotoxicidad en células U937 y MT-2.

Ejemplo 15

Índice de selectividad del Compuesto I y el Compuesto III contra HIV-1

15 Los datos precedentes permiten calcular los valores del índice de selectividad (SI), basándose en la relación de CC_{50} a EC_{50} en células MT-4 (el ensayo estándar usado en este trabajo).

La CC_{50} del Compuesto I en células T MT-4 era 27 μM frente a una EC_{50} de 1,2 nM, dando un SI > 22.000. La CC_{50} del Compuesto III era 18,6 μM frente a una EC_{50} de 1,0 nM, para un SI de > 18.000. De forma similar, se estimó que el índice de selectividad del fármaco de control era: EFV = 37.000. Estos valores están muy de acuerdo con valores del SI presentados previamente (Young et al., 1995, Antimicrob Agents Chemother; 39(12):2602-5; Andries et al., 2004, Antimicrob Agents Chemother; 48(12):4680-6; Janssen et al., 2004, J Med Chem; 48(6):1901-9; Boone 2006, Curr. Opin Investig Drugs; 7(2): 128-35).

20 Usando los datos de citotoxicidad y actividad derivados en PBMC, se podrían computar valores del SI de > 100.000 para el Compuesto I y el Compuesto III.

Citotoxicidad celular a más largo plazo en otros tipos de células humanas

25 Finalmente, la citotoxicidad in vitro de los artículos de prueba se determinó en otras líneas celulares humanas con importancia toxicológica; células hepáticas HuH7 y HepG2 (Knowles et al., 1980, Science; 209(25):497-9) y células epiteliales HeLa (Gey et al., 1952, Cancer Research; 12:264-5) a través de tinción de viabilidad con MTS. Las células se trataron repetidamente con un intervalo de concentraciones de fármaco (de 0,005 a 100 μM) durante 9 (HeLa) o 12 días (HuH7, HepG2). Los valores medios de CC_{50} y las desviaciones estándar derivados de 3 a 5 experimentos independientes se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22

Citotoxicidad celular en líneas celulares humanas seleccionadas

Compuesto	Valores promedio de CC_{50} (μM) $\pm$ Desviación estándar		
	HeLa ^{a,d}	HuH7 ^{b,e}	HepG2 ^{c,e}
I	27,88 $\pm$ 1,14	23,49 $\pm$ 1,61	25,69 $\pm$ 3,26
III	29,86 $\pm$ 2,09	31,46 $\pm$ 3,37	23,50 $\pm$ 1,51
EFV	48,57 $\pm$ 2,50	75,72 $\pm$ 12,43	80,56 $\pm$ 12,12

CC_{50} = concentración eficaz que reduce la viabilidad celular en 50%.

35 Los números representan valores medios $\pm$ desviación estándar derivados de 3 a 5 experimentos independientes como se indica: ^a = 3-4; ^b = 4-5; ^c = 3-5.

^d células HeLa se cultivaron en placa a 1×10^3 células/pocillo y se incubaron en presencia de fármaco durante 9 días. El fármaco y el medio se reemplazaban cada 3 días.

^e células HuH7 y HepG2 se cultivaron en placa a 1×10^3 y 7×10^3 células/pocillo, respectivamente, y se incubaron durante 12 días en presencia de fármaco. El fármaco y el medio se reemplazaban cada 3 días.

40 Las tendencias observadas en esta prueba de citotoxicidad a más largo plazo reflejan las observadas en los

estudios precedentes. En general, el Compuesto I y el Compuesto III daban valores de CC_{50} similares en las 3 líneas celulares, variando de 23 a 32 μM . De nuevo, el EFV era el menos citotóxico de los compuestos (intervalo de CC_{50} 48-81 μM).

Ejemplo 16

5 Datos comparativos in vitro

Los Compuestos I y III, los correspondientes enantiómeros (es decir, los compuestos II y IV) y los correspondientes racematos se evaluaron en el ensayo estándar basado en células de HIV BH10 descrito anteriormente. El grupo de prueba estándar incluía virus natural, así como los derivados con mutación dirigida Y181C, K103N y K103N/Y181C.

10 La tabla posterior proporciona datos para el compuesto I, el compuesto II y su correspondiente racemato. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el racemato tenía EC_{50} de 2,4 a 6,2 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto I tenía EC_{50} de 0,6 a 3,5 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C y K103N, el compuesto II tenía EC_{50} de 129 a 920 nM.

Actividad contra virus HIV-1 BH10 en un ensayo celular

	BH10		K103N		Y181C		Y181C/K103N	
Comp.		n		n		n		n
I	0,001 $\pm$ 0,0005	8	0,0006 $\pm$ 0,0002	3	0,0026 $\pm$ 0,0011	3	0,0035 $\pm$ 0,0014	3
I	0,0007 $\pm$ 0	1	0,0009 $\pm$ 0	1	0,0024 $\pm$ 0	1	0,003 $\pm$ 0	1
II	0,1917 $\pm$ 0	1	0,9201 $\pm$ 0	1	0,3637 $\pm$ 0	1		
rac	0,0025 $\pm$ 0,0004	3	0,0024 $\pm$ 0,0007	3	0,0032 $\pm$ 0,0006	3	0,0062 $\pm$ 0,0036	3

15 EC_{50} = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

^a N = número de experimentos repetidos realizado.

^b Virus BH10 natural y con mutación dirigida adaptados al laboratorio.

20 La tabla posterior proporciona datos para el compuesto III, el compuesto IV y su correspondiente racemato. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el racemato tenía EC_{50} de 1,6 a 24,4 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto III tenía EC_{50} de 0,6 a 23,1 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto IV tenía EC_{50} de 89,2 a 824 nM.

Actividad contra virus HIV-1 BH10 en un ensayo celular

	BH10		K103N		Y181C		Y181C/K103N	
Comp.		n		n		n		n
III	0,001 $\pm$ 0,0005	10	0,0013 $\pm$ 0,0005	5	0,0028 $\pm$ 0,0005	5	0,0114 $\pm$ 0,0023	5
III	0,0018 $\pm$ 0,0003	3	0,0016 $\pm$ 0,0005	3	0,0040 $\pm$ 0,0005	3	0,0231 $\pm$ 0,0121	3
III	0,0006 $\pm$ 0	1	0,0006 $\pm$ 0	1	0,0029 $\pm$ 0	1	0,0045 $\pm$ 0	1
IV	0,1902 $\pm$ 0,0038	2	0,3776 $\pm$ 0,2047	2	0,8241 $\pm$ 0,3636	2		0
IV	0,0892 $\pm$ 0,1068	2	0,1053 $\pm$ 0,0579	2	0,2286 $\pm$ 0,0605	2	0,5167 $\pm$ 0	1
IV	0,0976 $\pm$ 0	1	0,3123 $\pm$ 0	1	0,331 $\pm$ 0	1		0
rac	0,031 $\pm$ 0,0002	2	0,0031 $\pm$ 0,0005	2	0,0049 $\pm$ 0,0011	2	0,0167 $\pm$ 0,0088	2
rac	0,0017 $\pm$ 0	1	0,0017 $\pm$ 0	1	0,0016 $\pm$ 0	1	0,0042 $\pm$ 0	1
rac	0,0025 $\pm$ 0,0007	3	0,0025 $\pm$ 0,0013	3	0,005 $\pm$ 0,0037	3	0,0244 $\pm$ 0,0188	3

EC_{50} = concentración eficaz que reduce la producción de virus en 50% en cultivo celular.

25 ^a N = número de experimentos repetidos realizado.

^b Virus BH10 natural y con mutación dirigida adaptados al laboratorio.

Según se muestra en las tablas anteriores, en estos ensayos la mayoría de, si no toda, la actividad de la mezcla racémica reside en los enantiómeros R de los compuestos I y III.

Ensayo de protección celular

- 5 Los Compuestos I y III, los correspondientes enantiómeros (es decir, los compuestos II y IV) y los correspondientes racematos se evaluaron en un ensayo de protección celular. El grupo de prueba estándar incluía virus natural, así como derivados con mutación dirigida Y181C, K103N y K103N/Y181C.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO en 15 mM y a continuación se diluyeron en medio de cultivo RPMI 1640 + 2 g/l de NaHCO_3 + solución de kanamicina al 1% 100 veces (10.000 $\mu\text{g/ml}$) + FCS al 10% +/- DMSO al 1,2%.

- 10 Se sembraron células MT-4 (Fuente: NIH N° Catálogo 120) sobre placas de cultivo celular de 96 pocillos (1×10^4 células por pocillo en 50 μl).

- 15 Diluciones dobles en serie de los compuestos de prueba en 50 μl (0,29 μM a 75 μM) se añadieron a las células en medio de crecimiento completo (RPMI, suero de ternero fetal al 10%, penicilina-estreptomicina) y las células se infectaron con una parte alícuota de 20 μl de una suspensión de HIV (cepa BH10 de HIV-1 natural y virus resistentes Y181C, K103N y Y181C/K103N) a una dilución que da 90% de efecto citopático. La concentración de DMSO final en el ensayo era 0,5% en 120 μl . A continuación, los cultivos celulares se incubaron a 37°C/CO₂ al 5% durante 4 días. A continuación, se usó el Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) para medir la viabilidad celular. Brevemente, se añadió el One Solution Reagent directamente a los pocillos de cultivo (20 $\mu\text{l/pocillo}$), se incubaron durante 5 horas, y se registró la absorbancia a 492 nm usando el Sunrise Tecan Spectrophotometer.

Los valores de EC₅₀ se determinaron a partir de los datos de porcentaje de inhibición frente a la concentración usando un análisis de regresión no lineal sigmoideo basado en cuatro parámetros con el paquete informático Tecan Magellan.

- 25 La tabla posterior proporciona datos para el compuesto I, el compuesto II y el correspondiente racemato. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C el racemato, tenía EC₅₀ de 1,5 a 7,0 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto I tenía EC₅₀ de 0,26 a 3,5 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto II tenía EC₅₀ de 62 a más de 1.000 nM.

Actividad contra virus HIV-1 BH10 en un ensayo de protección celular

	BH10	K103N	Y181C	Y181C/K103N
Comp.				
I	0,00028 ± 0,000072	0,00026 ± 0,000057	0,0018 ± 0,00029	0,0035 ± 0,0015
II	0,062 ± 0,019	0,217 ± 0,099	0,424 ± 0,21	> 1
rac	0,0015 ± 0,0007	0,001 ± 0	0,0045 ± 0,0007	0,007 ± 0,0028

- 30 EC₅₀ = concentración de compuesto que alcanzaba 50% de reducción del efecto citopático del virus.

La tabla posterior proporciona datos para el compuesto III y su correspondiente racemato. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el racemato tenía EC₅₀ de 0,2 a 9,0 nM. Contra el virus BH10 natural y los virus mutantes Y181C, K103N y K103N/Y181C, el compuesto III tenía EC₅₀ de 0,14 a 6,6 nM.

Actividad contra virus HIV-1 BH10 en un ensayo de protección celular

	BH10	K103N	Y181C	Y181C/K103N
Comp.				
III	0,00015 ± 0,00011	0,00014 ± 0,000052	0,0015 ± 0,0006	0,0066 ± 0,00097
IV				
rae	0,0002 ± 0,0001	0,0003 ± 0	0,0023 ± 0,0005	0,009 ± 0,0048

- 35 EC₅₀ = concentración de compuesto que alcanzaba 50% de reducción del efecto citopático del virus.

Unión a, inhibición e inducción de citocromo P450

Los Compuestos I y III, los correspondientes enantiómeros (es decir, los compuestos II y IV) y los correspondientes

racematos se evaluaron en ensayos para la unión a citocromo P450.

Se efectuaron estudios de inhibición para evaluar el potencial de los compuestos I y III para inhibir la actividad catalítica de isoenzimas CYP450 de proteínas microsómicas de hígado humano. La velocidad de formación de metabolitos de sustratos de sondas específicas para CYP450 por microsomas hepáticos humanos se determinó en presencia y ausencia de Compuesto I o III. También se evaluó la inhibición directa así como la inhibición dependiente del tiempo, también conocida como una inhibición basada en el mecanismo o MBI (por sus siglas en inglés). Los estudios iniciales determinaron los valores de IC_{50} con determinación posterior de k_i o k_{inact} y k_i para MBI, cuando se apreciaba una inhibición notable ($IC_{50} < 10 \mu M$). Además, también se evaluó el tipo de inhibición.

Los compuestos se ensayaron usando proteínas microsómicas humanas recombinantes con sustratos fluorométricos. La señal se midió con un lector de placas Fusion utilizando la longitud de onda de excitación y emisión apropiada fijada para detectar el metabolito específico:

Enzima	Sustrato	Excitación (anchura de banda)	Emisión (anchura de banda)
CYP1A2	CEC	400 nm (20 nm)	535 nm (25 nm)
CYP2B6	EFC	400 nm (20 nm)	535 nm (25 nm)
CYP2D6	AMMC	400 nm (20 nm)	460 nm (35 nm)
CYP3A4	BFC	400 nm (20 nm)	535 nm (25 nm)

La inhibición de CYP2C9 se realizó incubando un sustrato de CYP450 luminogénico Luciferina-H con CYP2C9 y un sistema de regeneración de NADPH. Luminescencia medida usando un lector de placas Fusion.

Inhibición de isozima de citocromo P450 recombinante in vitro

Isozima CYP450	Concentración más alta probada (μM)	IC_{50} (μM) (I+II)	IC_{50} (μM) I	IC_{50} (μM) II	IC_{50} (μM) rac (III+IV)	IC_{50} (μM) III	IC_{50} (μM) IV
CYP1A2	20	NA	17,5%	NA	NA	17,6 $\pm$ 2,06	NA
CYP2B6	20	NA	21,6%	NA	NA	22,9%	NA
CYP2C9	10	NA	8,40 $\pm$ 0,67	NA	5,99	6,85 $\pm$ 0,48	3,38
CYP206	10	NA	11,2%	NA	16-23%	15,2%	29,1%
CYP3A4	10	1,608	1,46 $\pm$ 0,39	3,21	2,269	2,86 $\pm$ 0,18	2,962

Estudios de inhibición IC_{50} = concentración inhibidora al 50% (μM) o porcentaje de inhibición a la concentración más alta probada

Los valores representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes

NA no disponible

Se efectuaron estudios cinéticos de inhibición de isozima de citocromo P450 usando microsomas hepáticos humanos. La velocidad de formación de metabolitos de sustratos de sondeo específicos para CYP450 por microsomas hepáticos humanos combinados se determinó en presencia y ausencia de inhibidores estándar o Compuesto I o III (0, 0,01, 0,1, 1, 10 y 50 μM). También se investigó la inhibición dependiente del tiempo evaluando el efecto de la preincubación con compuesto I o III (30 minutos) sobre la inhibición de enzimas CYP450 (en concentraciones como las apuntadas anteriormente) con microsomas. Se determinaron los valores de IC_{50} para la inhibición tanto directa como dependiente del tiempo cuando la inhibición alcanzaba niveles de más de 50%. Por otra parte, se examinó la inhibición directa de CYP2C8 y CYP2C9 por el compuesto I o III (en concentraciones de 0, 1, 3, 6, 9 y 12 μM) determinando el valor de K_i y el tipo de inhibición.

Además, se determinaron los valores de K_i para la inhibición directa de CYP2C8 y CYP2C9, los valores de K_{inact} y K_i para la inhibición dependiente del tiempo de CYP3A4 (testosterona y midazolam) por el compuesto I o el compuesto III. El compuesto I y el compuesto III en 0, 0,0125, 0,125, 1,25, 12,5 y 62,5 μM para CYP3A4 (midazolam y testosterona) se preincubaron con microsomas hepáticos humanos y NADPH durante 0, 1, 5, 10, 20 y 30 minutos a 37°C. Las incubaciones de control incluían un artículo de prueba en una sola concentración preincubado sin NADPH y un inhibidor de control positivo. La formación de metabolito se verificó mediante métodos de LC-MS/MS validados y se determinaron el porcentaje de actividad restante además de los valores de k_{inact} y K_i .

El Compuesto I exhibía una inhibición limitada ($IC_{50} > 20 \mu M$) de CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 y CYP2C19 (IC_{50} =

10,2 μM) y una inhibición notable ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) de CYP2C8, CYP2C9 y CYP3A4. El Compuesto I exhibía una inhibición competitiva de CYP2C8 y CYP2C9 con valores de k_i de 1,1 y 1,4 μM , respectivamente. Debido a que CYP3A4 tiene múltiples puntos de unión, la inhibición típicamente se evalúa con dos sustratos de sondeo estructuralmente no relacionados, testosterona y midazolam. El Compuesto I exhibía una notable inhibición basada en el mecanismo de CYP3A4-testosterona y CYP3A4-midazolam con valores de k_i de 0,14 y 0,18 μM , respectivamente.

Inhibición de isozimas de citocromo P450 microsómicas humanas in vitro con Compuesto I

isozima CYP450	K_i (μM)	K_{inact} (min^{-1}) ^c	Tipo de inhibición
CYP1A2 (Fenacetina) ^a	ND ^b		
CYP2B6 (Bupropiona)	ND		
CYP2C8 (Paclitaxel)	1,1		Competitiva
CYP2C9 (Diclofenac)	1,4		Competitiva
CYP2C19 (S-Mefenitoína)	ND		
CYP2D6 (Dextrometorfano)	ND		
CYP3A4 (Midazolam)	0,36	0,072	Inhibición basada en el mecanismo
CYP3A4 (Testosterona)	0,14	0,033	Inhibición basada en el mecanismo

^a= sustrato de sondeo específico para CYP450

^b= no determinado. Valores de k_i determinados para valores de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$

^c= velocidad máxima constante para la desactivación. Sólo importante para la inhibición dependiente del tiempo.

El Compuesto III exhibía inhibición limitada ($\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$) de CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, inhibición marginal de CYP2C19 ($\text{IC}_{50} = 10,2 \mu\text{M}$) e inhibición notable ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) de CYP2C8, CYP2C9 y CYP3A4. El Compuesto III exhibía inhibición competitiva de CYP2C8 y CYP2C9 con valores de k_i de 0,66 y 0,93 μM , respectivamente. Debido a que CYP3A4 tiene múltiples puntos de unión, la inhibición típicamente se evalúa con dos sustratos de sondeo estructuralmente no relacionados, testosterona y midazolam. El Compuesto III exhibía una notable inhibición basada en el mecanismo de CYP3A4-testosterona y CYP3A4-midazolam con valores de k_i de 0,21 y 0,06 μM , respectivamente.

Inhibición de isozimas de citocromo P450 microsómicas humanas in vitro con Compuesto III

isozima CYP450	K_i (μM)	K_{inact} (min^{-1}) ^c	Tipo de inhibición
CYP1A2 (Fenacetina) ^a	ND ^b		
CYP2B6 (Bupropiona)	ND		
CYP2C8 (Paclitaxel)	0,66		Competitiva
CYP2C9 (Diclofenac)	0,93		Competitiva
CYP2C19 (S-Mefenitoína)	ND		
CYP2D6 (Dextrometorfano)	ND		
CYP3A4 (Midazolam)	0,06	0,06	Inhibición basada en el mecanismo
CYP3A4 (Testosterona)	0,21	0,05	Inhibición basada en el mecanismo

^a= sustrato de sondeo específico para CYP450

^b= no determinado. Los valores de IC_{50} eran $\geq 10 \mu\text{M}$. Valores de k_i sólo determinados para valores de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$

^c= velocidad máxima constante para la desactivación. Sólo importante para la inhibición dependiente del tiempo.

El potencial para la inducción in vitro de CYP3A4 se detectó sistemáticamente en células DPX2. La línea celular DPX2 es un derivado de una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) transformada con el receptor de pregnano x (PXR) humano y un vector génico informador que contenía la región potenciadora de CYP3A4. El potencial para la inducción in vitro de CYP1A2 se detectó sistemáticamente en células CYP1A2-DRE. La línea celular CYP1A2-DRE es una célula HepG2 establemente transformada con elementos de respuesta a dioxina (DRE, por sus siglas en inglés) y un gen informador que contiene elementos promotores de CYP1A2. El nivel

de inducción de CYP3A4 se determinó comparando la activación de PXR obtenida con un artículo de prueba con la obtenida con rifampicina (inductor potente), mifepristona (inductor moderado) y androstanol (inductor débil). El nivel de inducción de CYP1A2 se determinó comparando la activación del receptor de arilhidrocarbona (AhR) obtenida con un artículo de prueba con la obtenida con TCDD (inductor potente), omeprazol (inductor moderado) y 2-acetilaminofluoreno (inductor débil).

5

Compuesto	Inducción	
	DPX2 (CYP3A4)	CYP1A2-DRE (CYP1A2)
rac (I + II)	NA	NA
I	Moderada (n=2)	Sin inductor (n=1)
II	NA	NA
rac (III + IV)	Moderada (n=1)	NA
III	Moderada (n=2)	Sin inductor (n=1)
IV	Moderada (n=1)	NA

NA = no disponible

Según se muestra en la tabla anterior, los compuestos I y III son inductores moderados de CYP3A4 y CYP1A2.

Unión a proteínas plasmáticas in vitro

10

La unión a proteínas plasmáticas in vitro del compuesto I y el compuesto III en plasma de rata, perro, mono y ser humano se determinó mediante diálisis de equilibrio. La unión a proteínas se examinó mediante diálisis de equilibrio usando plasma de rata, perro, mono y ser humano. Las muestras se ensayaron mediante HPLC con detección por LC-MS/MS. La unión a proteínas plasmáticas era alta (> 99%) para todas las especies y para ambos compuestos.

Unión a proteínas del Compuesto I y el Compuesto III

Especies	Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas	
	Compuesto I	Compuesto III
Ratas	99,1	99,4
Perros	99,0	99,4
Monos	99,9	99,9
Seres humanos	99,8	99,9

Ejemplo 17

15

Inhibición de citocromo P450 in vitro

Efectos del Compuesto I y el Compuesto III en combinación con otros agentes

Se llevaron a cabo estudios de interacción in vitro que implicaban al Compuesto I y al Compuesto III y compuestos de las clases NRTI y PI activos contra HIV.

20

El efecto in vitro de cada fármaco antirretroviral sobre la actividad antiviral de cualquier artículo de prueba se probó por triplicado sobre la infección por virus HIV-1 natural de células T humanas MT-4 usando un ensayo de sensibilidad a fármacos (DSA) estándar realizado en suero humano (HS) al 45% para proporcionar una mejor estimación de las interacciones que se podrían producir bajo condiciones de unión a proteínas encontradas in vivo. El Compuesto I o el Compuesto III se valoraron solos o en combinación con cada NRTI o PI.

25

El impacto de cada NRTI o PI sobre la eficacia del Compuesto I o Compuesto III se probó a dos concentraciones de fármaco diferentes, una concentración "baja" (1 vez) y una "alta" (5 veces); la concentración alta usada para cada compuesto se determinó a partir de experimentos piloto efectuados para asegurar que todavía se pudieran obtener valores de inhibición medibles en presencia de HS al 45%.

30

Estos estudios de interacción fármaco-fármaco in vitro se pusieron en marcha principalmente para determinar el potencial de interacciones negativas entre las diferentes clases de fármacos para el HIV, en lugar de para examinar el potencial de sinergia entre los diferentes agentes.

En resumen, ninguno de los siete fármacos NRTI para HIV o los seis fármacos PI para HIV exhibía una interacción

negativa o antagónica medible con el Compuesto I o el Compuesto III contra el HIV en estos experimentos in vitro.

Ejemplo 18

Metabolismo

5 El metabolismo de los compuestos I y III se evaluó en células de rata, perro, mono y ser humano, y la inhibición de citocromo P450 se evaluó en microsomas hepáticos humanos.

Métodos

10 Hepatocitos recientes se cultivaron en placa sobre placas revestidas con colágeno y se expusieron a los compuestos de prueba en 1 μ M durante hasta 2 horas. Se ensayó medio de cultivo tisular con respecto al agotamiento del compuesto mediante detección por LC/MS. Los valores de la Tabla 23 representan experimentos independientes de 5 a 7 donantes.

15 La inhibición de la actividad de CYP450 se determinó verificando cambios en el metabolismo de sustratos específicos para CYP450 por microsomas hepáticos humanos con concentraciones variables de compuesto I o III. El sustrato de sondeo para 2C8 era paclitaxel, el sustrato de sondeo para 2C9 era diclofenac y para 3A4 los sustratos de sondeo eran midazolam y testosterona. Se usan dos sustratos para examinar las interacciones de 3A4 debido a los múltiples puntos de unión sobre la enzima.

Resultados

Tabla 23

Agotamiento de compuesto en hepatocitos		
	$t_{1/2}$ (min)	
Especie	Compuesto I	Compuesto III
Rata	33 $\pm$ 26	17 $\pm$ 15
Perro	28 $\pm$ 14	21 $\pm$ 10
Mono	63 $\pm$ 40	52 $\pm$ 24
Ser humano	215 $\pm$ 48	125 $\pm$ 55

Como se muestra en la tabla anterior, tanto el compuesto I como el compuesto III exhibían metabolismo in vitro limitado en hepatocitos humanos.

Inhibición de la isozima CYP450		
	K_i (mM)	
	Compuesto I	Compuesto III
2C8	1,10	0,66
2C9	1,45	0,93
3A4	0,36	0,06

20 Como se muestra en la tabla anterior, tanto el compuesto I como el compuesto III mostraban inhibición competitiva de CYP2C8 y CYP2C9. Por otra parte, tanto el compuesto I como el compuesto III mostraban una inhibición basada en el mecanismo de CYP3A4. La inhibición basada en el mecanismo se caracteriza por una pérdida dependiente del tiempo de la actividad enzimática, asociada con la unión covalente entre la enzima y un producto intermedio metabólico reactivo. La inhibición basada en el mecanismo también está asociada con la inducción de CYP450 ya

25 que se requiere nueva enzima para restaurar la actividad enzimática. No se observaba inhibición de CYP 2D6, 1A2, 2B6 y 2C19.

Metabolismo del Compuesto I y III frente a los correspondientes racematos

30 El metabolismo in vitro se examinó usando microsomas hepáticos para todas las especies. Los compuestos se incubaron en 1 μ M con microsomas hepáticos durante hasta una hora. Las semividas presentadas mayores que el tiempo de incubación total son valores extrapolados. Los extractos se ensayaron con respecto a la desaparición del compuesto originario mediante detección por LC-MS/MS.

Los datos representan un experimento independiente efectuado.

Semivida in vitro de los compuestos I y III y los racematos en microsomas hepáticos

Especie	I	rac (I + II)	III	rac (III + IV)
Semivida (min.)				
Rata	100	146	8 8,8	105
Perro	19,3	287	13,2	257
Mono	15,4	18,4	12,6	16,3
Ser humano	120,6	115	154	91,2

Como se muestra en la tabla anterior, los compuestos I y III enantiómeros puros tenían semividas significativamente más cortas en microsomas hepáticos cuando se comparaban con sus correspondientes enantiómeros.

Ejemplo 19

5 Farmacocinética in vivo

La farmacocinética de los compuestos I y III se evaluó en ratas (compuesto III solamente), perros y monos.

Métodos

10 Todos los animales recibieron una sola dosis oral o intravenosa de compuesto bien en polietilenglicol 400 (PEG400) o bien en una mezcla de etanol (EtOH) al 10%, dimetilacetamina (DMA) al 10% y PEG400 al 80% al nivel de dosis indicado. Los datos de concentración en plasma se adquirieron usando métodos de LC-MS/MS sensibles y específicos. Los datos farmacocinéticos procedentes del estudio de toxicidad incluían aspectos de diferencias de género, variabilidad y exposición.

15 Se recogieron muestras de sangre (1,5-2,5 ml) en tubos heparinizados a los 0 (antes de la dosis), 5 (IV solamente), 10, 20, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 (PO solamente) y 24 h después de la dosificación. El plasma se separó y se almacenó a -70°C hasta el análisis.

Se identificaron las concentraciones de compuesto I y compuesto III no marcado dentro de muestras de plasma y excreciones de estudios farmacocinéticos de rata, perro y mono a través de métodos cromatográficos de líquido de alta resolución (HPLC) que incorporaban detección espectrométrica de masas en tándem (LC-MS/MS).

20 La biodisponibilidad oral absoluta se determinó en la farmacocinética por comparación de los valores del AUC del compuesto originario después de dosis intravenosa y oral únicas en ratas (compuesto III solamente), perros y monos.

25 La biodisponibilidad oral de ambos compuestos (5 mg/kg) a partir de los estudios farmacocinéticos exploratorios era 38% en ratas (compuesto III solamente), 4-9% en perros y 42-58% en monos. Aunque la biodisponibilidad del compuesto III en ratas era superior que en perros y comparable a los monos, las ratas tenían una exposición según AUC muy inferior en comparación con perros y monos.

30 También se estimó la biodisponibilidad absoluta para ambos compuestos a partir de estudios en monos a 5 mg/kg. La biodisponibilidad absoluta del compuesto III era 42% en machos y 76% en hembras, sugiriendo una diferencia de género potencial en la exposición sistémica. La biodisponibilidad del compuesto I, calculada usando los valores medios del AUC, era 54% en machos y 61% en hembras. Sin embargo, el valor para los machos se ha subestimado, ya que la absorción en un animal era baja y las concentraciones en plasma parecía estar incrementando todavía a las 8 horas después de la dosis. Basándose en los valores del AUC, y excluyendo a este animal para el que no se podía calcular el AUC, la biodisponibilidad en los machos era 75%.

35 Después de una dosis oral de 5 mg/kg, las concentraciones en plasma a las 24 horas después de la dosis eran 12 ng/ml para el compuesto III y 17,9 ng/ml para el compuesto I. Una dosis oral de 5 mg/kg en el mono es equivalente (basándose en la superficie corporal) a una dosis para ser humano de aproximadamente 100 mg (véase *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation y Research, julio de 2005). Este nivel de compuesto a las 24 horas después de la dosis apoya la dosificación una vez al día.

40

Biodisponibilidad oral de los Compuestos I y III

Especie	Dosis (mg/kg) ^a	Vía de administración	Nº animales/Género	T _{máx} (h)	BA (%)
Compuesto I					
Perro	5	Oral-Alimentación	2M, 1H	0,3 ^b	9
Mono	5	Oral-Alimentación	3M	2,7 ^b	58
Mono	5	Oral-Alimentación	3M	4,0 ^c	54
Mono	5	Oral-Alimentación	3H	4,0 ^c	61
Compuesto III					
Rata	10	Oral- Ayunas	3M	0,4 ^b	38
Perro	5	Oral-Alimentación	1M, 1H	1,5 ^b	4
Perro	20	Oral-Alimentación	1M, 1H	2,2 ^b	23
Mono	5	Oral-Alimentación	2M	3,0 ^b	42
Mono	5	Oral-Alimentación	3M	2,0 ^c	42
Mono	5	Oral-Alimentación	3H	2,0 ^c	75
Mono	20	Oral-Alimentación	2M	2,5 ^b	61

BA = biodisponibilidad oral absoluta

a = Las ratas, los perros y los monos recibían una sola dosis oral bien del Compuesto I o bien del Compuesto III. Adicionalmente, las ratas recibían una dosis IV de 2 mg/kg y los perros y los monos recibían una dosis IV de 1 mg/kg.

b = Media

c = Valor mediano

Ejemplo 20

Toxicología

10 Las toxicidades potenciales de los compuestos I y III se evaluaron in vivo en ratas y monos.

Métodos

15 A ratas Sprague-Dawley y monos cynomolgus se les dosificó una vez al día durante 14 días a través de una sonda oral el compuesto I o el compuesto III o el vehículo para la dosis (Capmul PG-8 al 68%, PEG 400 al 20%, Tween 20 al 2% y Labrasol al 10%) según las GLP. Había 10 ratas machos y 10 hembra, y había 3 monos macho y 3 hembra. A las ratas y los monos se les dosificaron 0, 50, 150 o 500 mg/kg/día de compuesto I o 0, 50, 150, 450 mg/kg/día de compuesto III.

Se examinó la toxicidad usando las observaciones clínicas, los pesos corporales, el consumo de alimento y la patología clínica (hematología, coagulación y química sérica).

20 Se realizó una necropsia exhaustiva y un examen patológico a simple vista sobre todos los animales y se recogieron órganos y tejidos seleccionados para la evaluación histológica.

Se efectuaron sobre todas las muestras determinaciones del hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de eritrocitos, el recuento de leucocitos total y el recuento de plaquetas. Se realizaron exámenes diferenciales y morfológicos de los leucocitos.

25 Las determinaciones de la bioquímica clínica incluían las actividades de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) y las concentraciones de nitrógeno de urea en sangre (BUN), creatinina, proteína total, albúmina, globulina, glucosa, colesterol, triglicéridos, bilirrubina total y los niveles de electrolitos (Na, K, P, Cl, Ca).

30 Se evaluaron muestras de orina (monos solamente) macroscópicamente y microscópicamente y se probaron con respecto al pH, la bilirrubina, la glucosa, la proteína, las cetonas, la sangre, el urobilinógeno, los nitritos, los leucocitos y el peso específico.

Resultados

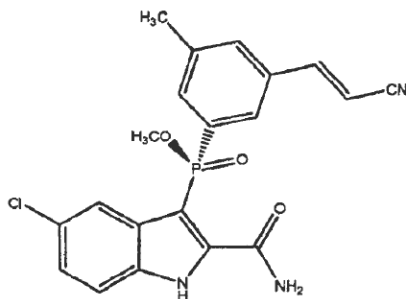
- 5 No se asociaban efectos sobre el consumo de alimento o diferencias en el peso corporal con la dosificación del compuesto I o el compuesto III. No se observaban hallazgos clínicos relacionados con el tratamiento y no se observaban cambios toxicológicamente significativos en los parámetros de la química hematológica o sérica o hallazgos en el urianálisis.

No se observaba un efecto toxicológicamente significativo sobre los pesos (absolutos o relativos) de los órganos, con la excepción de pesos de hígado incrementados en ratas (sólo hembras) y monos tratados con compuesto III a las dosis medias y altas. Sin embargo, estos hígados eran microscópicamente irrelevantes.
- 10 En ratas tratadas con compuesto I y compuesto III, se observaba una hipertrofia/hiperplasia de células foliculares de mínima a media en todos los grupos de dosis excepto las hembras tratadas con compuesto III en dosis bajas. El impacto sobre la función tiroidea no se podía fijar ya que los niveles de hormona tiroidea y TSH en circulación no se examinaban.

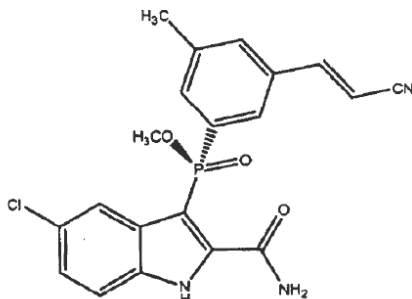
No se observaban otras lesiones macroscópicas, hallazgos microscópicos o hallazgos histopatológicos en ratas o monos.
- 15 Esta invención se ha descrito con referencia a ciertas realizaciones. Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos normales en la especialidad a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar en la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



2. Un compuesto de la siguiente fórmula:



5

3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1 o 2 que es enantiómeramente puro.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición farmacéutica está sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto.

10 5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1 o 2 en al menos 80%, 90%, 95% o 99% en peso del enantiómero indicado, basado en el peso total de todos los enantiómeros del compuesto.

6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1 o 2 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico.

15 7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que está en una forma de dosificación oral farmacéuticamente aceptable.

8. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que comprende además un segundo agente anti-HIV.

20 9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que el segundo agente anti-HIV es un inhibidor de proteasa o un inhibidor de integrasa.

10. The composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el segundo agente anti-HIV es amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir, lopinavir, ritonavir, fosamprenavir, darunavir, atazanavir, nelfinavir, brexanivir, GS-8374, elvitegravir, GSK-364735 o raltegravir.

25 11. El compuesto según la reivindicación 1 o 2 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para el uso en un método para tratar una infección por HIV.

12. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, que se ha de administrar en combinación o alternancia con al menos un segundo agente anti-HIV.

30 13. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 12, en donde el segundo agente anti-HIV es un inhibidor de proteasa, un inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídico o nucleotídico, un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico, una combinación de dosis fijas, un inhibidor de la fusión, un antagonista del correceptor CCR5, un inhibidor de la maduración o un inhibidor de integrasa.

14. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 13, en donde el segundo agente anti-HIV es amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir, lopinavir, ritronavir, fosamprenavir, darunavir, atazanavir, nelfinavir, lamivudina, emtricitabina, abacavir, zalcitabina, zidovudina, tenofovir, didanosina, estavudina, delavirdina, efavirenz, nevirapina, Atripla, Combivir, Trizivir, Truvada, maraviroc, enfuvirtida, amdoxovir, apricitabina, elvucitabina, brecanivir, GS-8374, Aplaviroc, PRO₂000, Vicriviroc, Etravirine, Rilpivirine, Calanolide A, Bevirimat, Elvitegravir, GSK-364735 o raltegravir.
15. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, que se ha de administrar en combinación o alternancia con un agente anti-HBV.
16. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en donde el agente anti-HBV es entecavir, lamivudina, un interferón, adefovir dipivoxil, telbivudina, emtricitabina, clevudina, tenofovir, valtorcitabina, amdoxovir, LB80380, remofovir o racivir.
17. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, que se ha de administrar en combinación con un segundo compuesto eficaz para el tratamiento o la prevención de una infección por HCV.
18. El compuesto o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, que se ha de administrar oralmente una vez al día.

Figura 1A

Estructura cristalina de RT de HIV-1 K103N/Y181C con el Comp.

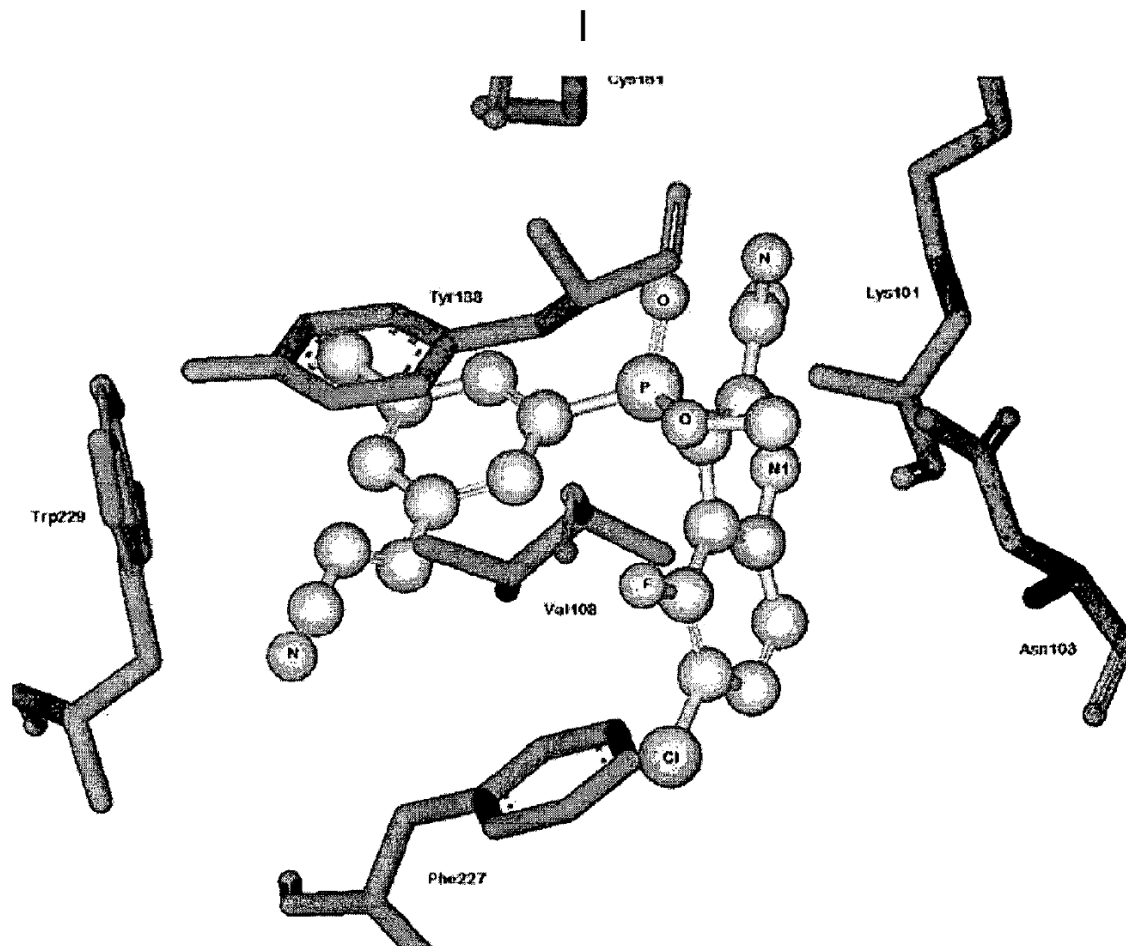


Figura 1B

Estructura esquemática de RT K103N/Y181C de HIV-1 con el Comp. I

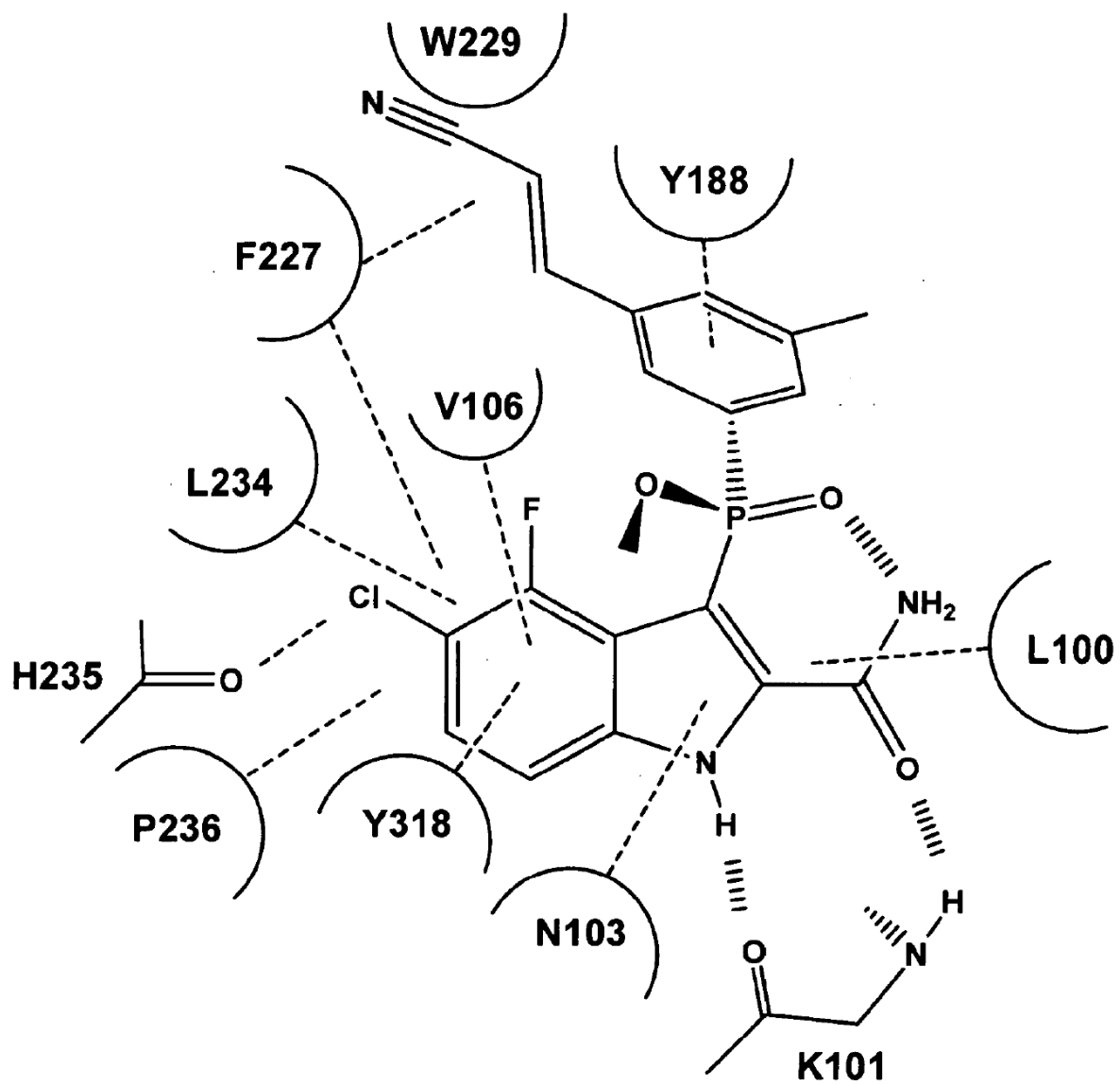


Figura 2A

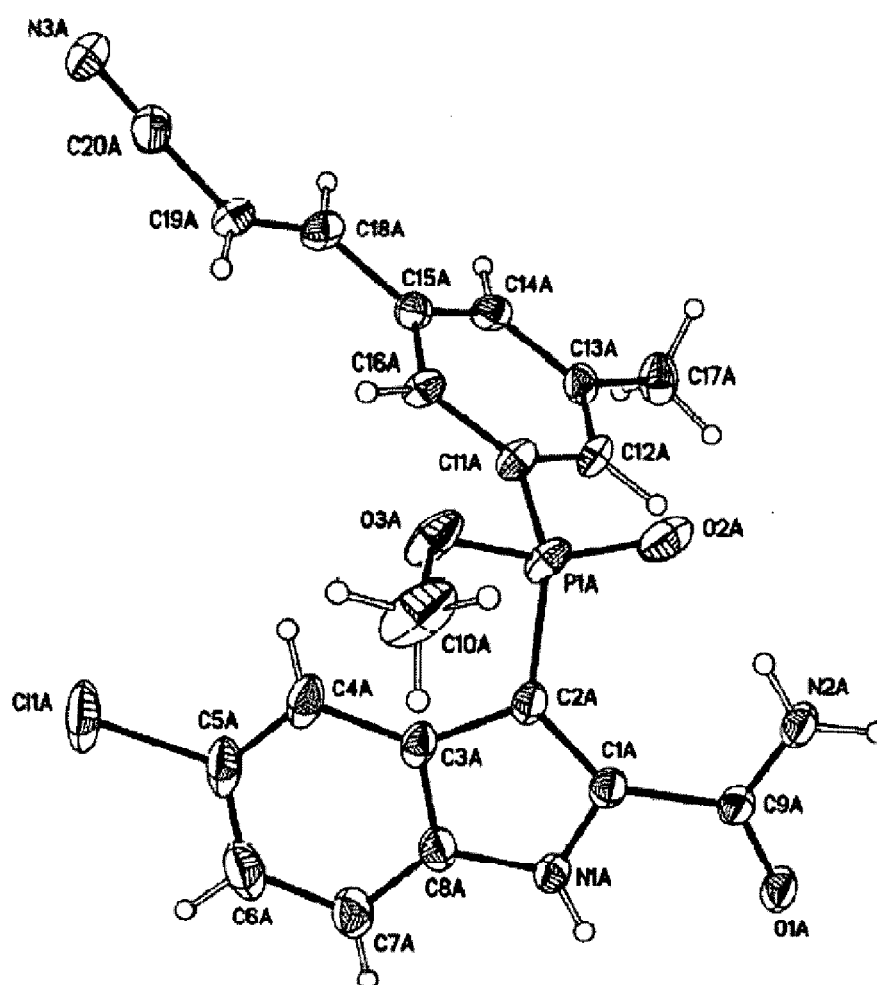


Figura 2B

