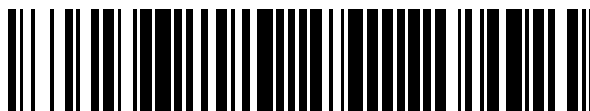


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 217**

51 Int. Cl.:

C07C 279/22	(2006.01)	A61P 31/18	(2006.01)
A61K 31/415	(2006.01)	C07D 213/69	(2006.01)
C07D 231/12	(2006.01)	C07D 333/22	(2006.01)
A61K 31/155	(2006.01)		
A61K 31/435	(2006.01)		
C07D 307/54	(2006.01)		
A61K 31/341	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
C07D 317/60	(2006.01)		
A61K 31/36	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 06741271 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1902017**

54 Título: **Compuestos de acilguanidina antivirales**

30 Prioridad:

24.06.2005 AU 2005903360

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

05.09.2014

73 Titular/es:

**BIOTRON LIMITED (100.0%)
Level 2 66 Hunter Street
Sydney, New South Wales 2000, AU**

72 Inventor/es:

**EWART, GARY DINNEEN y
BEST, WAYNE MORRIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 491 217 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

Compuestos de acilguanidina antivirales

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos y a composiciones que tienen actividad antiviral. La invención también se refiere a métodos para retardar, reducir o inhibir de otro modo el crecimiento viral y/o la actividad funcional.

Antecedentes de la invención

10 Actualmente, existe la gran necesidad del desarrollo de nuevos tratamientos que sean eficaces frente a infecciones virales, particularmente frente a infecciones virales que se asocian con alta morbimortalidad, y que tienen un impacto sobre poblaciones importantes. Los tratamientos disponibles actualmente son inadecuados o ineficaces en grandes proporciones de pacientes infectados.

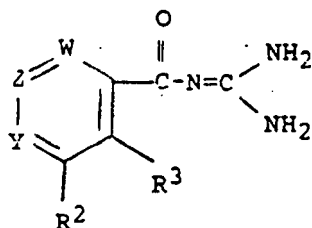
Un gran número de virus contribuye a la reserva de patógenos humanos significativos. Los ejemplos de éstos incluyen los virus de las familias de *Lentivirus* y *Flavivirus*, por ejemplo VIH, virus de la hepatitis C (VHC), virus del dengue.

15 Para mejorar la perspectiva de tratar y prevenir infecciones virales, y para ocuparse de la evolución viral en curso, existe la necesidad continuada de identificar moléculas que puedan inhibir diversos aspectos del ciclo de vida viral. Varios de tales compuestos se dan a conocer en el documento PCT/AU2004/000866 (WO 2004/112687). Sin embargo, todavía existe la necesidad de composiciones novedosas y agentes con actividad antiviral adicionales.

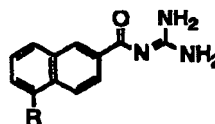
20 Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 45, n.º 8. 1997, páginas 1282-1286 describe un método básico de síntesis para naftoilguanidina y halo o alcoxiderivados.

Arzneimittel-Forschung, vol. 25, n.º 10, 1975, páginas 1477-1482 describe la síntesis de una nueva serie de fenilacetilguanidinas. Varias de ellas mostraron alta actividad antihipertensiva en la rata. El miembro más potente de la serie es clorhidrato de N-amidino-2-(2,6-diclorofenil)acetamida [clorhidrato de 2,6-diclorofenilacetilguanidina, compuesto 19]. Se analizan las relaciones estructura-actividad en esta clase de compuestos.

25 El documento WO 94/26709 A1 describe compuestos, en particular compuestos que tienen benzoil-guanidina como estructura original (véase la fórmula (I))



30 El documento US 4.251.545 A describe principalmente benzoil-guanidinas, aunque también se describe alcoxi-naftil- como sustituyente de carbamil-guanidina primario. Se describe el uso de los compuestos para proteger plantas y partes de planta frente a un ataque fúngico.



El documento JP 08 225513 A describe naftoilguanidinas del tipo: en la que R es halógeno o alcoxilo. Los compuestos se dan a conocer para su uso frente a canales iónicos celulares.

El documento DE 4421536 A1 describe compuestos que tienen grupos sustituyentes de per-fluoroalquilo en estructuras originales de benzoil-guanidina.

35 El documento EP 0810206 A1 describe diversos compuestos de 2-naftoilguanidina sustituidos.

El documento EP 0744397 A2 describe diversos compuestos de fluorocinamoil-guanidina.

Un objeto de la presente invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

40 Cualquier análisis de la técnica anterior en la totalidad de la memoria descriptiva no debe considerarse en modo alguno como un reconocimiento de que tal técnica anterior se conoce ampliamente o forma parte del conocimiento

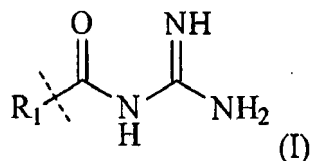
general común en el campo.

Sumario de la invención

5 Los inventores han encontrado sorprendentemente que determinados compuestos que se encuentran dentro de la clasificación de acilguanidinas sustituidas tienen actividad antiviral frente a virus de una gama de diferentes familias de virus. Varios de tales compuestos se dan a conocer en el documento PCT/AU2004/000866.

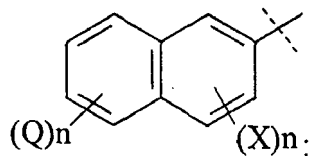
La presente invención se refiere a determinados compuestos antivirales novedosos que se encuentran dentro de la clasificación de acilguanidinas sustituidas.

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



10 en la que

R₁ es

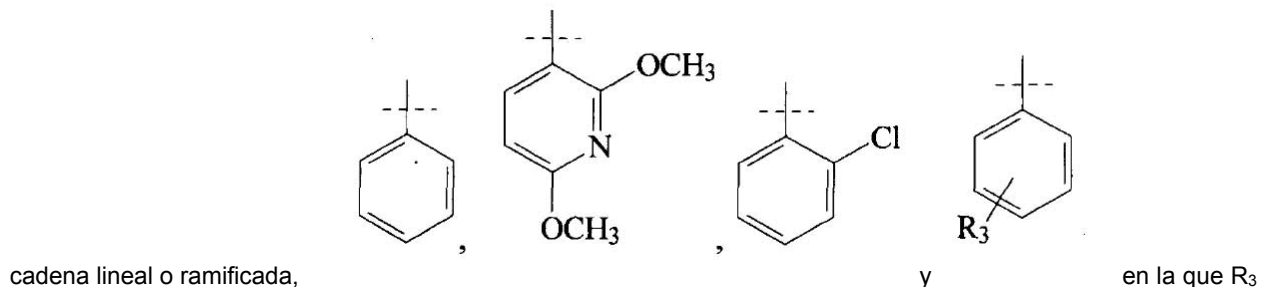
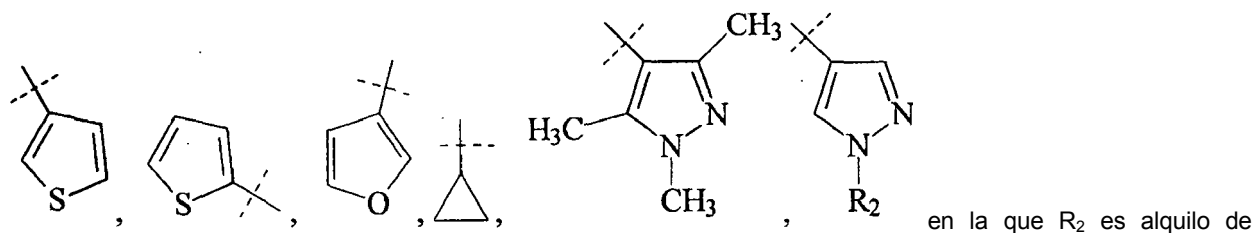


n es 1, 2, 3 ó 4;

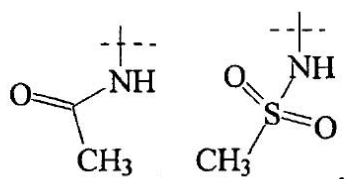
15 Q se selecciona independientemente de cicloalquilo, tienilo, furilo, pirazolilo, pirazolilo sustituido, piridilo, piridilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido y heterociclo y

X es hidrógeno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En determinadas realizaciones de la invención, Q se selecciona independientemente de



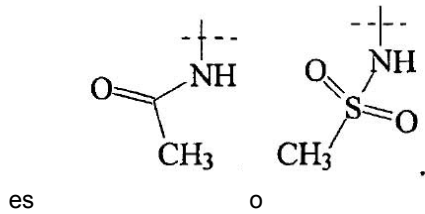
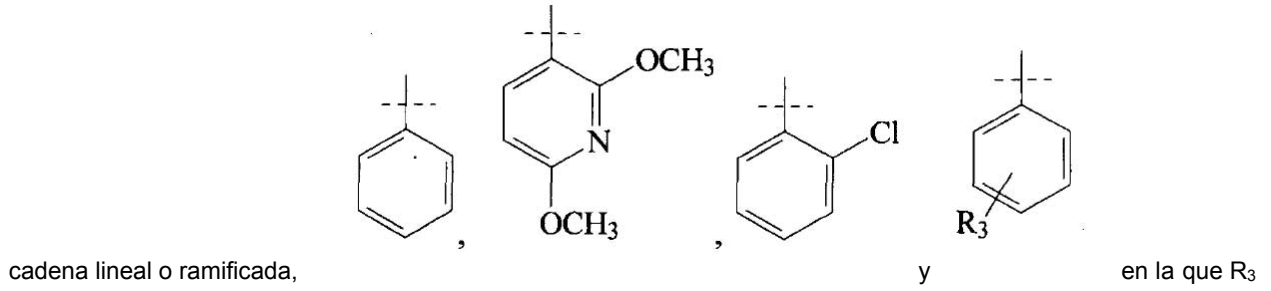
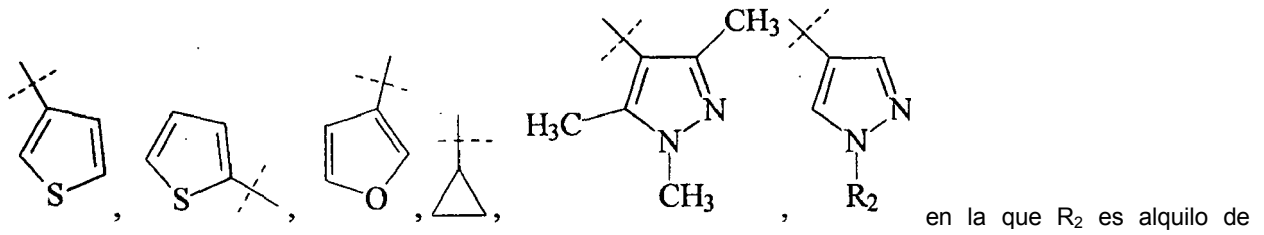
20 es



Preferiblemente, los compuestos de la invención incluyen los siguientes:

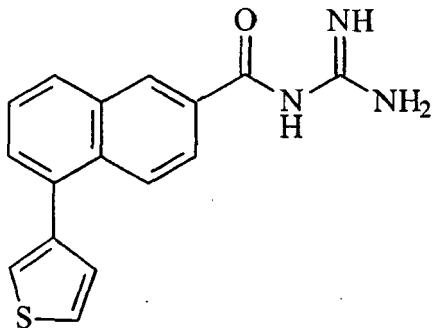
- (6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-fenil-2-naftoil)guanidina,
 (5-(tien-2-il)-2-naftoil)guanidina,
 5 (5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina,
 acetato de (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidinio,
 10 (5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(2-clorofenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(4-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(4-((metilsulfonyl)amino)fenil)-2-naftoil)guanidina, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 15 Los grupos amina o imina de la parte de guanidilo de los compuestos de fórmula I pueden estar presentes en cualquier forma convencional usada para la provisión de tales compuestos. Por ejemplo, pueden estar presentes como la base libre, un hidrato, una sal orgánica o inorgánica o combinaciones de los mismos.
- Preferiblemente, los compuestos de la invención presentan actividad antiviral y pueden reducir, retardar o inhibir de otro modo el crecimiento viral y/o la replicación.
- 20 Ejemplos de virus preferidos frente a los que los compuestos de la presente invención son activos, son virus de las familias de *Lentivirus* y *Flavivirus*. Más preferiblemente, el virus es el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del dengue. Lo más preferiblemente, el virus es VHC, VIH-1 y VIH-2.
- Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según el primer aspecto, y opcionalmente uno o más portadores o derivados aceptables farmacéuticos.
 25 Los compuestos activos pueden estar presentes en forma de cualquier sal, aducto adecuados, en formas anhidras o solvatadas.
- En una realización, las composiciones de la invención comprenden además uno o más compuestos o moléculas que tienen actividad antiviral conocidos. Los compuestos antivirales conocidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en vidarabina, aciclovir, ganciclovir, valganciclovir, valaciclovir, cidofovir, famciclovir, ribavirina, amantadina,
 30 rimantadina, interferón, oseltamivir, palivizumab, rimantadina, zanamivir, inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI) tales como zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina y abacavir, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI) tales como nevirapina, delavirdina y efavirenz, inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y otros compuestos y preparaciones antivirales conocidos.
- 35 Según un tercer aspecto, se proporciona un compuesto según el primer aspecto o una composición farmacéutica según el segundo aspecto para su uso en la reducción, el retardo o la inhibición de otro modo del crecimiento y/o la replicación de un virus.
- Según un cuarto aspecto, se proporciona un compuesto según el primer aspecto o una composición farmacéutica según el segundo aspecto para su uso en la prevención de la infección de una célula expuesta a un virus.
- 40 Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un compuesto según el primer aspecto o una composición farmacéutica según el segundo aspecto para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un sujeto expuesto a o infectado con un virus.
- Preferiblemente, el virus es de las familias de *Lentivirus* y *Flavivirus*. Más preferiblemente, el virus es el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del dengue. Lo más preferiblemente, el virus es VHC, VIH-1 y VIH-2.
 45

Preferiblemente, el sujeto que se somete al tratamiento terapéutico o profiláctico es un mamífero, tal como, pero no se limita a, un ser humano, primate, animal de ganado (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, burro, cerdo), animal de



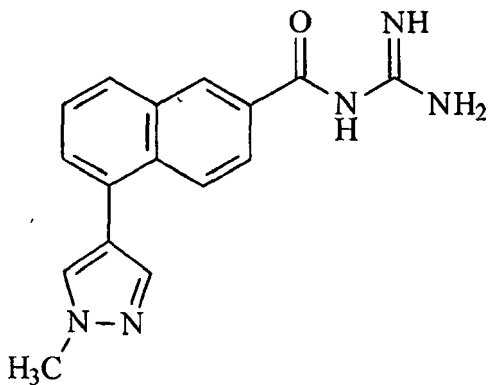
Pueden seleccionarse compuestos particularmente útiles de los siguientes:

- 5 5-tiofen-3-il-2-naftoilguanidina que comprende la estructura



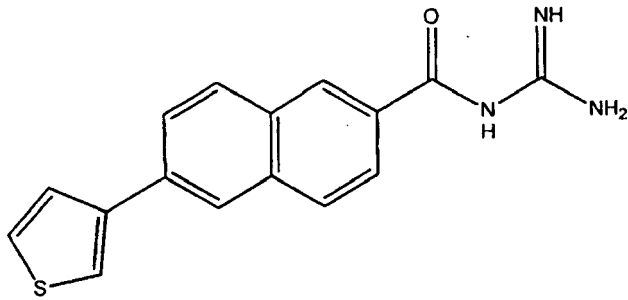
BIT-224

- 5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina que comprende la estructura



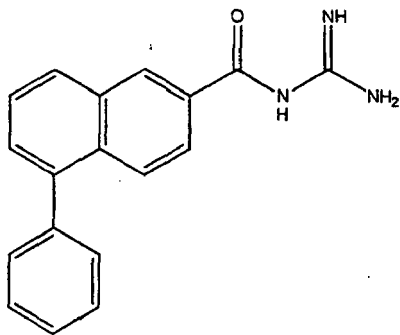
BIT-225

- (6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



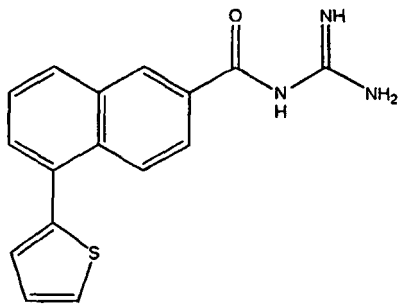
BIT-305

(5-fenil-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



BIT-307

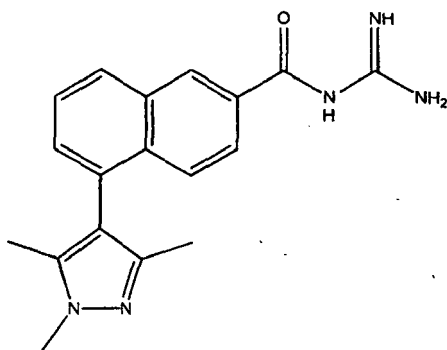
(5-tien-2-il)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



5

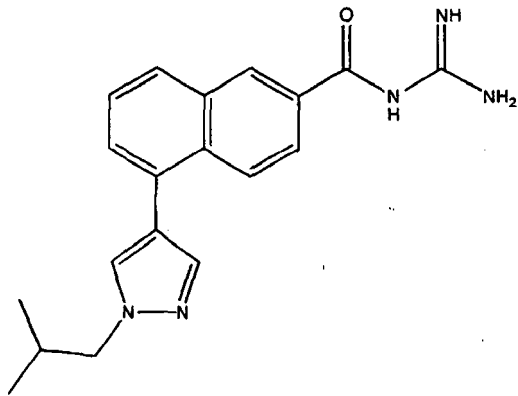
BIT-308

(5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



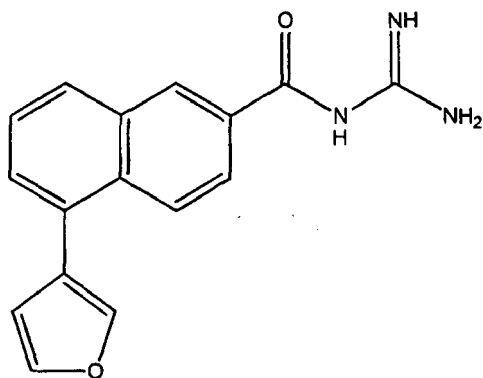
BIT-309

(5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



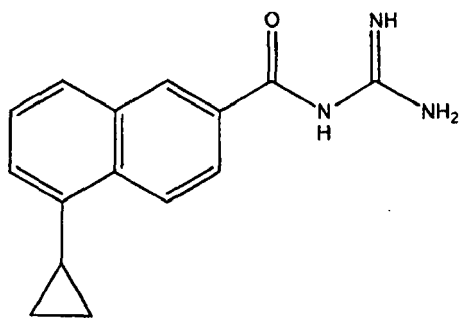
BIT-310

(5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



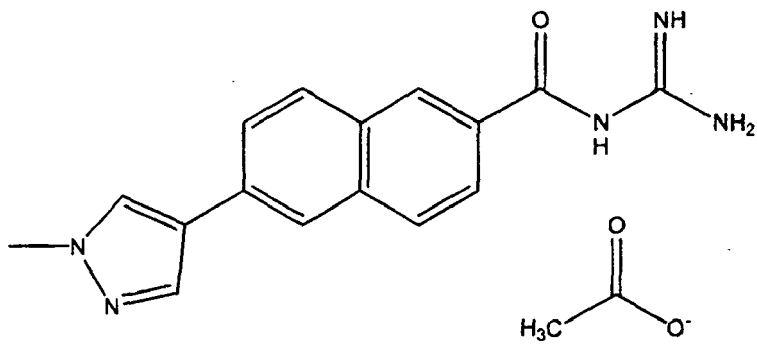
BIT-311

(5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina



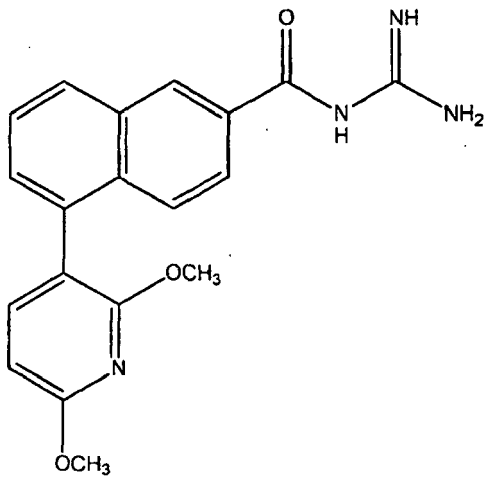
BIT-312

acetato de (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidinio



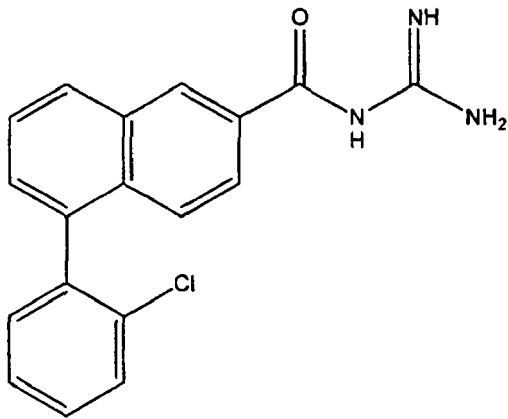
BIT-314

(5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina



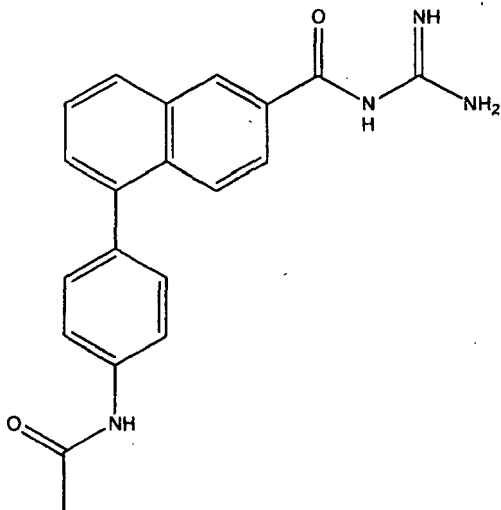
BIT-315

(5-(2-clorofenil)-2-naftoil)guanidina



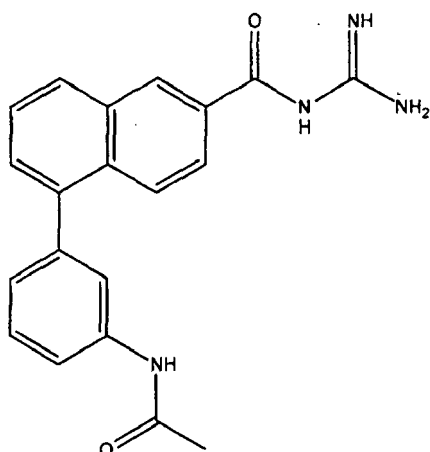
BIT-316

(5-(4-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina



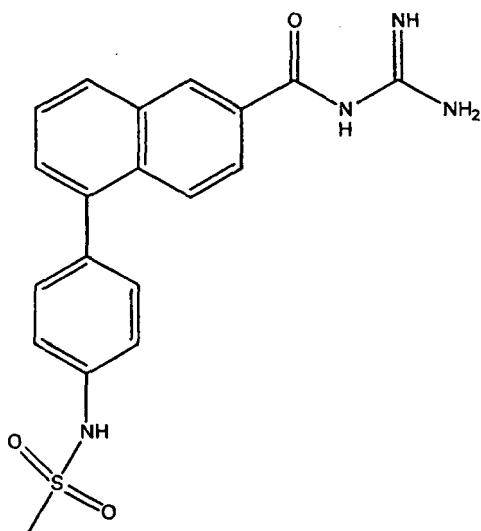
BIT-317

(5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina



BIT-318

(5-(4-((metilsulfonil)amino)fenil)-2-naftoil)guanidina



BIT-319

5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los grupos amina o imina de la parte de guanidilo de los compuestos de fórmula I pueden estar presentes en cualquier forma convencional usada para la provisión de tales compuestos. Por ejemplo, pueden estar presentes como la base libre, un hidrato, una sal orgánica o inorgánica o combinaciones de los mismos.

Los métodos desarrollados para examinar los compuestos de la presente invención para determinar su actividad antiviral se describen en detalle en el documento WO 2004/112687.

10 La referencia a "VIH", "VHC" y "virus del dengue" y similares, debe entenderse como una referencia a cualquier cepa de VIH, VHC o virus del dengue y que incluye homólogos y mutantes.

La referencia a la "actividad funcional" de un virus debe entenderse como una referencia a una cualquiera o más de las funciones que un virus realiza o en las que está implicado.

15 La referencia a la "replicación viral" debe entenderse que incluye una cualquiera o más fases o aspectos del ciclo de vida viral, tal como la inhibición del ensamblaje o la liberación de viriones. Por consiguiente, el método de la presente invención abarca la mediación de la replicación viral mediante la inducción de una cascada de etapas que conducen a la mediación de uno cualquiera o más aspectos o fases del ciclo de vida viral.

20 La referencia a una "célula" infectada con un virus debe entenderse como una referencia a cualquier célula, procariota o eucariota, que se ha infectado con un virus. Esto incluye, por ejemplo, líneas celulares inmortales o primarias, cultivos bacterianos y células *in situ*.

Los expertos en la técnica entenderán que los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de una composición o formulación que comprende portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más compuestos o moléculas antivirales conocidos. Preferiblemente, los compuestos antivirales conocidos se seleccionan del grupo que consiste

5 en vidarabina, aciclovir, ganciclovir, valganciclovir, valaciclovir, cidofovir, famciclovir, ribavirina, amantadina, rimantadina, interferón, oseltamivir, palivizumab, rimantadina, zanamivir, inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI) tales como zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina y abacavir, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI) tales como nevirapina, delavirdina y efavirenz, inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y otros compuestos y preparaciones antivirales conocidos.

10 El sujeto de la inhibición viral es un mamífero, tal como, pero no se limita a un ser humano, primate, animal de ganado (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, burro, cerdo), animal de compañía (por ejemplo, perro, gato), animal para pruebas de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya, hámster) o animal salvaje en cautividad (por ejemplo, zorro, ciervo). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

15 La presente invención es útil en el tratamiento y la profilaxis de una infección viral tal como, por ejemplo, VIH, VHC, dengue y otras infecciones virales. Por ejemplo, la actividad antiviral puede afectarse en sujetos que se sabe que están infectados con VIH con el fin de impedir la replicación del VIH, impidiendo de ese modo la aparición del SIDA. Alternativamente, la presente invención puede usarse para reducir la carga viral en suero o para aliviar los síntomas de la infección viral. Este concepto se aplica a cualquier infección viral.

La presente invención puede ser particularmente útil o bien en los estadios tempranos de una infección viral para impedir el establecimiento de un reservorio viral en células afectadas o bien como tratamiento profiláctico para aplicarse inmediatamente antes de o durante un periodo tras la exposición a una posible fuente de virus.

20 La referencia en el presente documento a "terapéutico" y "profiláctico" ha de considerarse en sus contextos más amplios. El término "terapéutico" no implica necesariamente que se trate un mamífero hasta la recuperación total. De manera similar, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no contraerá eventualmente un estado patológico. Por consiguiente, terapia y profilaxis incluyen mejora de los síntomas de un estado particular o prevención o reducción de otro modo del riesgo de desarrollar un estado particular. El término "profilaxis" puede considerarse como reducción de la gravedad de la aparición de un estado particular. La terapia también puede reducir la gravedad de un estado existente o la frecuencia de ataques agudos.

30 Según la presente invención, puede coadministrarse más de un compuesto o composición con uno o más de otros compuestos, tales como compuestos o moléculas antivirales conocidos. Por "coadministrarse" quiere decirse la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes mediante las mismas vías o vías diferentes o la administración secuencial mediante las mismas vías o vías diferentes. Por administración "secuencial" quiere decirse una diferencia temporal de desde segundos, minutos, horas o días entre la administración de los dos o más compuestos separados. Los compuestos antivirales objeto pueden administrarse en cualquier orden.

35 Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, transmucosa, o mediante infusión por vía oral, por vía rectal, mediante goteo i.v., parche e implante. Se prefieren particularmente las vías intravenosas.

40 Las composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede provocarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede provocarse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los demás componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido, por ejemplo, por esterilización por filtración o esterilización mediante otros medios apropiados. También se contemplan dispersiones y éstas pueden prepararse incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de aquéllos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, un método preferido de preparación incluye secado a vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución filtrada de manera estéril previamente.

55 Cuando los principios activos están protegidos de manera adecuada, pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o puede encerrarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o puede someterse a compresión para dar comprimidos. Para la administración terapéutica oral, pueden incorporarse excipientes en el compuesto activo y usarse en forma de comprimidos ingeribles,

comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,01% en peso, más preferiblemente el 0,1% en peso, incluso más preferiblemente el 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse, naturalmente, y puede ser convenientemente de entre el 1 y el 99%, más preferiblemente del 2 al 90%, incluso más preferiblemente del 5 al 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Se preparan composiciones o preparaciones preferidas según la presente invención de manera que una forma unitaria farmacéutica oral contiene entre 0,1 ng y 2000 mg de compuesto activo.

Los comprimidos, los trociscos, las píldoras, las cápsulas y similares también pueden contener los componentes tal enumerados más adelante en el presente documento: un aglutinante tal como goma, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saborizante tal como menta piperita, aceite de gaulteria o saborizante de cereza. Cuando la forma unitaria farmacéutica es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes otros materiales diversos como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como sabor a cereza o naranja. Cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

La presente invención también se extiende a formas adecuadas para la aplicación tópica tales como cremas, lociones y geles. En tales formas, puede ser necesario modificar los péptidos anticoagulantes para permitir la penetración de la barrera de superficie.

Procedimientos para la preparación de formas unitarias de dosificación y preparaciones tópicas están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica a partir de textos tales como Pharmaceutical Handbook. A Martindale Companion Volume ed. Ainley Wade decimonovena edición, The Pharmaceutical Press Londres, CRC Handbook of Chemistry and Physics ed. Robert C. Weast Ph D. CRC Press Inc.; Goodman and Gilman's; The Pharmacological basis of Therapeutics. novena ed. McGraw Hill; Remington; y The Science and Practice of Pharmacy. decimonovena ed. ed. Alfonso R. Gennaro Mack Publishing Co. Easton Pensilvania.

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. Se conoce bien en la técnica el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades diferenciadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación novedosas de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que va a conseguirse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos.

Las cantidades eficaces contempladas por la presente invención variarán dependiendo de la gravedad del estado y la salud y edad del receptor. En términos generales, las cantidades eficaces pueden variar desde 0,01 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal.

Las cantidades alternativas incluyen desde aproximadamente 0,1 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o desde 1,0 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal.

El sujeto de la inhibición viral es en general un mamífero, tal como pero no se limita a, un ser humano, primate, animal de ganado (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, burro, cerdo), animal de compañía (por ejemplo, perro, gato), animal para pruebas de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya, hámster), animal salvaje en cautividad (por ejemplo, zorro, ciervo). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano o un primate. Lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a ejemplos específicos que describen protocolos de síntesis, inhibición viral y otras propiedades antivirales de los compuestos de la presente invención. La síntesis y el examen para determinar compuestos que tienen actividad antiviral puede conseguirse mediante la gama

de metodologías descritas en el presente documento o descritas en más detalle en el documento WO 2004/112687.

Ejemplos

La actividad antiviral de todos los compuestos de la presente invención puede determinarse, y se ha determinado, usando los métodos descritos en el presente documento o descritos en detalle en el documento PCT/AU2004/000866. Además, los métodos para la síntesis de los compuestos de la invención, tanto genéricos como específicos, descritos en el presente documento, descritos en publicaciones de referencia o conocidos por lo demás por los expertos en la técnica, pueden usarse para preparar todos los compuestos de la presente invención.

Más específicamente, pueden sintetizarse acilguanidinas mediante una variedad de métodos que incluyen hacer reaccionar la guanidina (en general generada *in situ* a partir de su sal de clorhidrato) con un derivado activado de manera adecuada de un ácido carboxílico. Los ejemplos incluyen:

- i) síntesis a partir de cloruros de ácido, ejemplificada por Yamamoto *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1997, 45, 1282
- ii) síntesis a partir de ésteres sencillos, ejemplificada por la patente estadounidense 2.734.904
- iii) síntesis a partir de ácidos carboxílicos, mediante activación *in situ* por carbonildiimidazol, ejemplificada por la patente estadounidense 5.883.133.

Los precursores de ácido carboxílico requeridos para la preparación de las acilguanidinas descritas en el presente documento, se obtuvieron mediante una variedad de métodos diversos. Un gran número de los ácidos cinámicos sustituidos están disponibles comercialmente. Además, numerosos procedimientos para la síntesis de ácidos cinámicos sustituidos y sus ésteres sencillos se describen bien en la técnica, que incluyen:

- i) La reacción de ácido malónico con un aldehído aromático y una base (la condensación de Doebner), descrita en Chemical Reviews, 1944, 35, 156.
- ii) La reacción de anhídrido acético con un aldehído aromático y una base (la reacción de Perkin), descrita en Organic Reactions, 1942, 1, 210.
- iii) La reacción de ácido acrílico y ésteres sencillos del mismo con un haluro aromático o triflato aromático usando un catalizador de paladio (la reacción de Heck), descrita en Organic Reactions, 1982, 28, 345.
- iv) La reacción de un fosfonoacetato de trialquilo con un aldehído aromático y una base (la reacción de Horner-Emmons), descrita en Organic Reactions, 1977, 25, 73.

Varios ácidos naftoicos halo, hidroxilo y alcoxisustituidos sencillos o bien están disponibles comercialmente o bien se conocen en la técnica y éstos proporcionaron los materiales de partida para las naftoilguanidinas sustituidas.

Pueden prepararse a menudo ácidos naftoicos que están sustituidos con grupos alquilo, cicloalquilo, arilo y heterocíclicos haciendo reaccionar un ácido halonaftoico con un reactivo organometálico adecuado usando un catalizador de metal de transición. Una variante de este tipo de esta metodología que se usó para preparar varios de los ácidos naftoicos sustituidos usados como precursores de las naftoilguanidinas descritas en el presente documento, fue la reacción de formación de enlace carbono-carbono catalizada por paladio entre ácidos bromonaftoicos y un ácido borónico sustituido de manera adecuada (o éster de boronato) que se conoce ampliamente en la técnica como el acoplamiento de Suzuki (descrito en Chemical Reviews, 1995, 95, 2457 y las referencias en ese documento). La reacción tiene amplia aplicabilidad y puede usarse en una gama de halonaftalenos sustituidos que luego pueden elaborarse adicionalmente para introducir o desenmascarar el grupo ácido carboxílico requerido.

40 1. Metodología general de síntesis

1.1 Procedimiento general A - Preparación de triflatos de arilo

A una disolución del fenol (10 mmol) en piridina (7 ml) a 0°C se le añadió lentamente anhídrido trifluorometanosulfónico (11 mmol, 1,1 eq.). Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante unos 5 minutos adicionales antes de permitir que se calentase hasta temperatura ambiente y se agitó hasta que el análisis de CCF mostró que se había consumido el fenol de partida. Entonces se vertió la mezcla en agua y se extrajo con acetato de etilo (3 veces). Se lavaron los extractos combinados de manera secuencial con agua, ácido clorhídrico acuoso 1 M, agua y salmuera, luego se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío dando el producto en bruto. Se cromatografiaron los productos en bruto sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los triflatos de arilo deseados, en general como aceites incoloros.

50 1.2 Procedimiento general B - Ésteres de cinamato mediante la reacción de Heck de triflatos

Se calentó una mezcla del triflato de fenilo (10 mmol), acrilato de metilo (14 mmol, 1,4 eq.), trietilamina (40 mmol,

4 eq.) y diclorobis(trifenilfosfina)paladio (0,3 mmol, 0,03 eq.) en dimetilformamida (30 ml) a 90°C. Se monitorizó la reacción mediante CG/EM y se añadieron nuevos lotes de acrilato de metilo (1 eq.), trietilamina (2 eq.) y el catalizador de paladio (0,03 eq.) según se requirió, en un esfuerzo para forzar la reacción a completarse. Entonces se vertió la mezcla en agua y se extrajo con una mezcla 1:1 de dietil éter/hexanos (3 veces). Se lavaron los extractos combinados con agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron a través de una capa de gel de sílice y se concentró el filtrado a vacío dando el producto en bruto como un aceite. Se cromatografiaron los productos en bruto sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de metilo deseados, en general como aceites incoloros.

1.3 Procedimiento general C - Ésteres de cinamato mediante la reacción de Heck de bromuros

10 Se añadió el bromuro de arilo (10 mmol), acetato de paladio (0,1 mmol, 0,01 eq.) y tri-*o*-tolilfosfina (0,4 mmol, 0,04 eq.) al matraz de reacción y se purgó con nitrógeno. A esto, luego se añadieron acrilato de metilo (12,5 mmol, 1,25 eq.), trietilamina (12,5 mmol, 1,25 eq.) y dimetilformamida (1 ml) y se calentó la mezcla a 100°C. Se monitorizó la reacción mediante CG/EM y se añadieron nuevos lotes de acetato de paladio (0,01 eq.), tri-*o*-tolilfosfina (0,04 eq.), acrilato de metilo (1,25 eq.) y trietilamina (1,25 eq.) según se requirió, en un esfuerzo para forzar la reacción a completarse. Se vertió la mezcla en agua y se extrajo con una mezcla 1:1 de dietil éter/hexanos (4 veces). Se lavaron los extractos combinados con agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron a través de una capa de gel de sílice y se concentró el filtrado a vacío dando el producto en bruto. Se cromatografiaron los productos en bruto sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de metilo deseados, en general como aceites incoloros.

20 1.4 Procedimiento general D - Ésteres de cinamato mediante la reacción de Horner-Emmons

Se añadió una disolución de fosfonoacetato de trietilo (13 mmol, 1,3 eq.) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml), a lo largo de 5 minutos, a una suspensión de hidruro de sodio (14,3 mmol, 1,4 eq.) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Entonces se agitó la mezcla a 0°C durante 20 minutos. Entonces se añadió una disolución del benzaldehído (10 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml) a lo largo de 10 minutos a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante unos 30 minutos adicionales antes de permitir que se agitate a temperatura ambiente hasta que el análisis de CG/EM o de CCF mostró que se había consumido el material de partida de benzaldehído. Normalmente, se permitió que las reacciones se agitasen a temperatura ambiente durante la noche para garantizar el consumo completo del aldehído de partida. Se vertió la mezcla en agua, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 veces). Entonces se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío dando el producto en bruto. Se cromatografiaron los productos en bruto sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de etilo deseados, en general como aceites incoloros.

1.5 Procedimiento general E - Preparación de ésteres 5-fenilpenta-2,4-dienoicos

35 Se añadió una disolución de 4-fosfonocrotonato de trietilo (26 mmol, 1,3 eq.) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml), a lo largo de 5 minutos, a una suspensión de hidruro de sodio (28 mmol, 1,4 eq., suspensión al 60% en aceite) en tetrahidrofurano anhidro (15 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Entonces se agitó la mezcla a 0°C durante 20 minutos. Luego se añadió una disolución del benzaldehído (20 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a lo largo de 10 minutos a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante unos 30 minutos adicionales y luego se permitió que se agitate a temperatura ambiente hasta que el análisis de CG/EM mostró que se había consumido el aldehído de partida. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 veces). Entonces se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío dando el éster etílico en bruto como un aceite. Se cromatografiaron los productos en bruto sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los ésteres etílicos deseados como aceites incoloros.

45 1.6 Procedimiento general F - Hidrólisis de ésteres

Se trató una disolución del éster (10 mmol) en metanol (50 ml) y agua (5 ml) con una disolución acuosa de hidróxido de potasio 6 M (20 mmol, 2 eq.) y se calentó la mezcla a reflujo hasta que el análisis de CCF mostró que ya no estaba presente el material de partida (habitualmente 2-3 horas). Entonces se vertió la mezcla en agua (50-200 ml) y se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta aproximadamente pH 2. Se recogió el ácido carboxílico resultante mediante filtración, se lavó con agua y se secó durante la noche a alto vacío.

1.7 Procedimiento general G - Reacciones de Suzuki de ácidos bromonaftoicos

55 Se añadieron el ácido bromo-2-naftoico (2 mmol), el ácido borónico apropiado (o éster de boronato) (2,2 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,1 mmol) y carbonato de sodio sólido (6,8 mmol) al matraz de reacción que luego se purgó con nitrógeno. Se añadieron acetonitrilo (6 ml) y agua (2,5 ml) y se calentó la mezcla a reflujo con agitación vigorosa hasta que se hubo consumido el ácido bromo-2-naftoico de partida. Entonces se repartió la mezcla de reacción entre tolueno (50 ml) y disolución de hidróxido de sodio 0,5 M (100 ml). Se lavó la fase acuosa con tolueno (para retirar cualquier cantidad de trietilfosfina, 3 x 20 ml) luego se acidificó hasta pH 1 con ácido clorhídrico concentrado. Se extrajeron los derivados de ácido naftoico en acetato de etilo (4 x 20 ml). Se lavaron los extractos

de acetato de etilo combinados con agua (3 x 20 ml) y con salmuera (10 ml), luego se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron. Se analizó el residuo mediante $^1\text{H-RMN}$ y se cromatografiaron sobre gel de sílice (si se requirió).

1.8 Procedimiento general H - Preparación de acilguanidinas

5 A una suspensión/solución de ácido carboxílico (10 mmol, 1,0 eq.) en diclorometano (30 ml) que contenía una gota de dimetilformamida se le añadió cloruro de oxalilo (12 mmol, 1,2 eq.) lo que provocó efervescencia en la disolución. Tras agitarse durante 2 h, se evaporó la disolución resultante hasta sequedad a presión reducida. Se disolvió el residuo en tetrahidrofurano seco (30 ml) y se añadió a una disolución de clorhidrato de guanidina (50 mmol, 5,0 eq.) en hidróxido de sodio acuoso 2 M (30 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 h y luego se separó la fase de tetrahidrofurano. Se extrajo la fase acuosa con cloroformo (100 ml) seguido por acetato de etilo (100 ml) y se evaporaron las fases orgánicas combinadas a presión reducida. Se repartió el residuo resultante entre cloroformo (200 ml) e hidróxido de sodio acuoso 2 M (100 ml) y se separó la fase orgánica y se secó (Na_2SO_4). Se filtró la disolución y se evaporó a presión reducida hasta el punto en el que comenzó a precipitar un sólido. En este punto, se añadieron hexanos que provocaron la precipitación del producto que se recogió mediante filtración y que se secó a alto vacío.

15 2. Ejemplos experimentales de síntesis

Ejemplo 1: 4-Hidroxiindano

Se añadió 4-aminoindano (3,0 g) a una disolución de ácido sulfúrico concentrado (2,4 ml) en agua (15 ml). Se añadió más agua (15 ml) y se enfrió la mezcla hasta 5°C . Se añadió en porciones una disolución de nitrato de sodio (1,71 g) en agua (4,5 ml) a la mezcla mientras se mantenía la temperatura por debajo de 5°C . Tras completarse la adición, se permitió que la mezcla se calentase hasta temperatura ambiente y se añadió urea (0,29 g). Se agitó la mezcla durante unos 5 minutos adicionales antes de calentarse a 45°C durante 30 minutos. Entonces se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con hidróxido de sodio acuoso 2 M (2 x 100 ml) y luego se acidificaron estos extractos acuosos con ácido clorhídrico y se extrajeron con acetato de etilo (3 x 100 ml). Entonces se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera y se secaron (Na_2SO_4) antes de concentrarse a vacío. Se cromatografió el producto en bruto resultante sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:7) dio 4-hidroxiindano como un aceite naranja (1,0 g).

Ejemplo 2: Triflato de 4-indanilo

30 A una disolución de 4-hidroxiindano (1,2 g, 8,9 mmol) en piridina (5 ml) a 0°C se le añadió lentamente anhídrido trifluorometanosulfónico (1,6 ml, 9,8 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 5 minutos antes de permitir que se calentase hasta temperatura ambiente y luego se agitó durante 45 minutos. Entonces se vertió la mezcla en agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Se lavaron los extractos combinados de manera secuencial con agua, ácido clorhídrico acuoso 1 M, agua y salmuera, luego se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a vacío dando el triflato en bruto como un aceite naranja (2,13 g, 89%).

Ejemplo 3: 3-(Indan-4-il)acrilato de metilo

35 Se calentó una mezcla de triflato de 4-indanilo en bruto (2,13 g, 8,0 mmol), acrilato de metilo (1,01 ml, 11,2 mmol), trietilamina (4,4 ml, 32 mmol, 4 eq.) y diclorobis(trifenilfosfina)paladio (170 mg, 0,24 mmol) en dimetilformamida (15 ml) a 85°C durante 71 horas. Se retiró una pequeña alícuota y se sometió a tratamiento final para el análisis de CG/EM que reveló que todavía estaba presente una cantidad significativa de material de partida. Se añadieron acrilato de metilo (0,7 ml), trietilamina (2 ml) y el catalizador de paladio (170 mg) adicionales y se calentó la mezcla durante unas 24 horas adicionales. Entonces se vertió la mezcla en agua, se extrajo con acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos con agua, luego con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a vacío dando el producto en bruto como un aceite (2,4 g). Se cromatografió el producto en bruto sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:19) dio el triflato de partida (812 mg, 38%) como un aceite incoloro, seguido por el 3-(indan-4-il)acrilato de metilo deseado como un aceite marrón (880 mg, 54%).

45 Ejemplo 4: 3-Benzoilcinamato de metilo

50 A una mezcla de 3-bromobenzofenona (5,0 g, 19 mmol), acetato de paladio (215 mg, 0,958 mmol) y tri-*o*-tolilfosfina (290 mg, 0,953 mmol) se le añadió trietilamina (3,3 ml, 45 mmol), tolueno (4 ml) y acrilato de metilo (2,2 ml, 27 mmol). Se calentó la mezcla a 100°C durante 18 horas, tiempo en el que el análisis de CCF mostró que la reacción todavía era incompleta. Se añadieron porciones adicionales de acetato de paladio (215 mg, 0,958 mmol), tri-*o*-tolilfosfina (290 mg, 0,953 mmol), trietilamina (3,3 ml, 45 mmol) y acrilato de metilo (2,2 ml, 27 mmol) y se calentó la mezcla a 110° durante unas 18 horas adicionales. Tras enfriarse hasta temperatura ambiente, se vertió la mezcla en agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados de manera secuencial con agua y con salmuera y luego se secaron (MgSO_4) y se concentraron dando un aceite marrón (5,3 g). Se cromatografió el aceite sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:9) produjo 3-benzoilcinamato de metilo (4,6 g, 91%) como un sólido amarillo.

Ejemplo 5: Ácido 3-benzoilcinámico

Se añadió hidróxido de potasio 5 M acuoso (10 ml, 50 mmol) a una disolución de 3-benzoilcinamato de metilo (2,5 g, 9,4 mmol) en metanol (20 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla y se acidificó hasta pH 1 usando ácido clorhídrico acuoso 1 M. Se recogió el precipitado resultante mediante filtración y se secó a vacío dando ácido 3-benzoilcinámico (2,2 g, 93%) como un sólido amarillo.

5 Ejemplo 6: Ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico

Se evacuó una mezcla de ácido 5-bromo-2-naftoico (2,12 g, 8,44 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (1,84 g, 8,86 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (502 mg, 0,435 mmol) en un matraz de fondo redondo 250 ml y se purgó con nitrógeno (en tres ciclos). Se añadieron acetonitrilo (40 ml) y carbonato de sodio acuoso 2 M (10 ml) a la mezcla mediante una jeringa, y se calentó la mezcla a reflujo bajo nitrógeno durante 22 horas. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriase antes de la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 M (30 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se secaron (MgSO₄) las fases orgánicas combinadas, se filtraron y se concentraron a vacío proporcionando un producto en bruto (2,98 g tras secarse al aire). Se disolvió el material en bruto en etanol caliente (150 ml) y se filtró mientras estaba caliente para retirar una impureza amarilla (120 mg). Se concentró el filtrado a vacío y se recristalizó el residuo en diclorometano (30 ml) proporcionando ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico como un sólido blanco (724 mg, 34%). Se obtuvo una segunda producción de ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico (527 mg, 25%) a partir de las aguas madre concentradas mediante recristalización en diclorometano (20 ml).

15 Ejemplo 7: 5-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoilguanidina

Se añadió cloruro de oxalilo (1,1 ml, 13 mmol) a una disolución de ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico (1,19 g, 4,71 mmol) en diclorometano anhidro (200 ml (que se añadió en porciones durante la reacción para efectuar la disolución)) que contenía dimetilformamida (2 gotas) bajo nitrógeno y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4,25 horas. Entonces se calentó la mezcla de reacción durante 1 hora a 40°C, antes de concentrarse a presión reducida. Se suspendió el cloruro de ácido en bruto resultante en tetrahidrofurano anhidro (50 ml) y se añadió gota a gota esta mezcla a una disolución de clorhidrato de guanidina (2,09 g, 21,9 mmol) en hidróxido de sodio acuoso 2 M (15 ml, 30 mmol) y luego se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con cloroformo (3 x 30 ml) seguido por acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados de manera secuencial con hidróxido de sodio acuoso 1 M (60 ml) y agua (40 ml), luego se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a vacío dando un sólido vítreo (1,45 g tras secado a alto vacío). Se disolvió este sólido en diclorometano que luego se permitió que se evaporase lentamente dando 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoilguanidina como un sólido amarillo (1,15 g, 83%).

20 Ejemplo 8: 2,3-Metilendioxicinamato de etilo

Se añadió gota a gota fosfonoacetato de trietilo (4,05 ml, 20,2 mmol) a una suspensión con agitación de hidruro de sodio (0,80 g, 20 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla a 0°C durante 20 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de 2,3-metilendioxi-benzaldehído (2,50 g, 16,7 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla durante 2 horas, tiempo durante el cual se permitió que se calentase hasta temperatura ambiente. Se vertió la mezcla en agua (250 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 ml). Entonces se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío. Se cromatografió el producto en bruto sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:10) dio 2,3-metilendioxicinamato de etilo como un sólido incoloro (3,50 g, 92%).

25 Ejemplo 9: Ácido 2,3-metilendioxicinámico

Se trató una disolución de 2,3-metilendioxicinamato de etilo (3,40 g) en metanol (25 ml) y agua (5 ml) con una disolución de hidróxido de potasio (4,3 g) en agua (25 ml). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente antes de concentrarse a vacío hasta la mitad de su volumen original. Entonces se acidificó el concentrado con HCl concentrado dando ácido 2,3-metilendioxicinámico como un sólido incoloro (2,81 g, 95%) que se recogió mediante filtración y se secó durante la noche a vacío.

30 Ejemplo 10: 2,3-Metilendioxicinamoilguanidina

Se añadió cloruro de oxalilo (0,68 ml, 7,8 mmol) a una suspensión de ácido 2,3-metilendioxicinámico (500 mg, 2,6 mmol) en diclorometano (5 ml) que contenía una gota de dimetilformamida. Se agitó la mezcla durante 2,5 horas y se evaporó la disolución resultante hasta sequedad a presión reducida. Se disolvió el residuo en tetrahidrofurano seco (5 ml) y se añadió a una disolución de clorhidrato de guanidina (1,24 g, 13 mmol) en hidróxido de sodio acuoso 2 M (8 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió cloroformo. Se recogió el precipitado resultante de producto en bruto (100 mg) mediante filtración. Se extrajo el filtrado con cloroformo (3 x 30 ml) y acetato de etilo (20 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con hidróxido de sodio acuoso 2 M (20 ml), con agua (20 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida dando una cantidad adicional de producto en bruto (400 mg). Se combinaron las dos producciones de producto en bruto, se suspendieron en cloroformo (10 ml) y se agitaron de manera vigorosa durante 20 minutos. Se recogió la 2,3-metilendioxicinamoilguanidina resultante (420 mg) mediante filtración y se secó a vacío.

Ejemplo 11: Ensayos de inhibición viral

Tal como se indicó anteriormente, se han descrito en detalle métodos usados para examinar la actividad antiviral de los compuestos de la presente invención en el documento WO 2004/112687.

5 Se sometió a prueba la inhibición, específicamente del crecimiento del VIH-1, por los compuestos de la invención en macrófagos primarios *in vitro* usando un método similar al usado para evaluar la neutralización de anticuerpos (VanCott TC *et al* (1999)). En el presente caso, se usó VIH-1 cepa Ba-L adaptado en laboratorio, que se sabe que infecta macrófagos.

11.1 Preparación de macrófagos

10 Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de donantes sanos usando paquetes de capa leucocítica obtenidos del Servicio de Sangre de la Cruz Roja Australiana (ARCBS, *Australian Red Cross Blood Service*). Se recibió la sangre al día siguiente de la donación y se había reducido de suero y plaquetas, lo que dejó un pequeño volumen (menos de 100 ml) de leucocitos concentrados.

15 Se separaron los leucocitos de las células sanguíneas y los granulocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll Paque) y se lavaron exhaustivamente en PBS⁻ (sin Ca/Mg) para retirar las plaquetas. Se permitió que las células recuperadas se adhiriesen a matraces de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) durante 2 h, 37°C, CO₂ al 5%, en medios (DMEM (alto)/suero AB al 10%/gentamicina 50 ug/ml/L-glutamina 2 mM) tiempo durante el cual las células mieloides formaron una monocapa adherente dejando linfocitos sin unir.

20 Se retiraron los linfocitos no adherentes lavando con PBS⁺ caliente (con Ca/Mg) y se desecharon en general. En algunos casos se recuperaron esas células y se congelaron en medios/DMSO al 10% para su uso en infecciones con disoluciones madre virales. Se recuperaron los monocitos adherentes rascando cuidadosamente con un rascador de células de plástico. Entonces se sembraron las células mieloides en placas de 96 pocillos a una concentración celular de $1,5 \times 10^6$ /ml, y se permitió que se diferenciaron totalmente a lo largo de un periodo de 14 días.

11.2 Protocolo de ensayo

25 Se permitió que los macrófagos se diferenciaron a lo largo de un periodo de 14 días, con cambios de medios según se requirió. En el día 14, se infectaron las células en presencia de concentraciones decrecientes de compuestos BIT en un intervalo de 0 – 10 μ M. Se retiraron muestras de los sobrenadantes de cultivo de 25 μ l de cada pocillo en el día 7 y se añadieron nuevos medios más dilución de compuesto.

11.3 Análisis de inhibición viral

30 Tras 7 días, se analizaron las muestras con y sin compuesto para evaluar el nivel de virus presente en los pocillos, usando un ELISA de p24 (Innotest). Se convirtieron los niveles de virus en las muestras en valores de “porcentaje de crecimiento del virus de control” basándose en los controles (que no contenían compuesto). A partir de esa curva de dosis-respuesta (figura 1 de ejemplo) se calculó la CI₅₀ y se usó como medida de la actividad anti-VIH del compuesto.

11.4 Citotoxicidad

40 Se determinó la toxicidad de los compuestos de prueba para las células en el ensayo de inhibición viral usando el ensayo de MTT (Pauwels R, *et al.* (1988); D’Cruz OJ *et al.* (1999); Joo H. (2003)). Este método utiliza azul de tiazolilo (MTT), que se añade al cultivo celular (100 ug/pocillo) y se incuba durante 4-5 horas mientras las células vivas, metabólicamente activas convierten el producto químico en su metabolito de color púrpura, que forma cristales intracelulares. Se mide colorimétricamente el color púrpura (570-590 nm) una vez que las células se han permeabilizado usando isopropanol acidificado que contiene Triton X-100 al 10%. El desarrollo de color más intenso se produce en los pocillos en los que son más numerosas las células metabolizantes.

45 Se convirtieron los valores de DO medidos en las cifras de “porcentaje de viabilidad” basándose en los controles (que no contenían compuestos) y pudo estimarse entonces el valor al que se midió una viabilidad celular del 50% (CT₅₀). Se estimaron esos valores manualmente a partir de las curvas de dosis-respuesta de porcentaje de viabilidad frente a concentración (figura 1).

11.5 Resultados

Se calcularon los valores de CI₅₀ para cada compuesto a partir de los experimentos individuales realizados y mostrados en las figuras 1 y 2.

50 Se tuvo en cuenta la toxicidad del compuesto para las células en cultivo en experimentos de inhibición y en experimentos separados que implicaban concentraciones aumentadas de compuesto.

Se calculó el valor del índice antiviral (IA) usando la fórmula:

$$IA = \frac{CT_{50}}{CI_{50}}$$

Tabla 1. Valores de CI_{50} , CT_{50} e IA para compuestos de prueba frente a VIH-1_{Ba-L} en macrófagos primarios.

N.º de compuesto	CI_{50} (μ M)	CT_{50} (μ M)	IA
(3-benzoil)cinamoilguanidina	0,9	25 – 495	28 – 550
2,3-metilendioxicinamoilguanidina	1,1	> 100	> 91
5-metil-2-naftoilguanidina	1,56	> 300	> 192
3(indan-4-il)-propenoilguanidina	> 10	> 100	> 10
5-bromo-6-metoxi-2-naftoilguanidina	0,3	> 300	> 1000
5-tiofen-3-il-2-naftoilguanidina	1,0	> 200	> 100
5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina	2,5	> 200	> 80

Se estimaron todos los valores de CI_{50} a partir de las curvas de dosis-respuesta mostradas en la figura 1. Se estimaron los valores de CT_{50} en experimentos separados (no mostrados) en los que eran mayores las concentraciones de compuesto.

5

Se sometieron a prueba compuestos adicionales usando el mismo sistema de ensayo y las mismas curvas de dosis-respuesta tal como se describió anteriormente, y se estimó su CI_{50} . La tabla 2 muestra un resumen de los datos obtenidos.

Tabla 2: Valores de CI_{50} estimados para compuestos adicionales de la invención

N.º de compuesto	CI_{50} (μ M)	CT_{50} (μ M)
(1-metoxi-2-naftoil)guanidina	< 2,5	> 50
(3-metoxi-2-naftoil)guanidina	< 2,5	> 50
(5-bromo-2-naftoil)guanidina	< 2,5	10 – 50
(1,4-dimetoxi-2-naftoil)guanidina	< 10	10 – 50
(6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina	< 0,63	< 10
(6-metil-2-naftoil)guanidina	< 10	10 – 50
(5-fenil-2-naftoil)guanidina	< 0,63	10 – 50
(5-(tien-2-il)-2-naftoil)guanidina	< 0,63	10 – 50
(5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina	> 10	> 50
(5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina	< 2,5	10 – 50
(5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina	< 0,63	10 – 50
(5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina	< 0,63	10 – 50
(5-cloro-2-naftoil)guanidina	< 2,5	10 – 50

10 Ejemplo 12: Actividad antiviral de compuestos usando el método de bioensayo bacteriano

Se describió en detalle el método de bioensayo bacteriano usado en el presente ejemplo para someter a prueba la actividad antiviral de los compuestos frente a diferentes dianas virales, en el documento WO 2004/112687. Se resumen los resultados de las pruebas de bioensayo bacteriano en la tabla 3 a continuación. Vpu, p7 y M a los que se hace referencia en la tabla son pequeñas proteínas de membrana codificadas por los virus VIH, VHC y del dengue, respectivamente, que tienen actividades funcionales que soportan el crecimiento y/o la replicación viral.

15

Tabla 2: Puntuaciones medias del ensayo de bioensayo bacteriano para compuestos de la invención

Nombre del compuesto	Puntuaciones promedio del ensayo bacteriano			
	N.º BIT	Vpu	p7 de VHC	M de den.
(3-benzoil)cinamoilguanidina	216	1,3	1,3	1,5
2,3-metilendioxicinamoilguanidina	217	1,8	1,0	
5-metil-2-naftoilguanidina	218	1,8	1,7	1,3
3(indan-4-il)-propenoilguanidina	222	1,2	2,0	2,2
5-bromo-6-metoxi-2-naftoilguanidina	223	0	0,0	
5-tiofen-3-il-2-naftoilguanidina	224	2,2	1,1	1,3
5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina	225	1,4	1,2	0,9
3,4-diclorocinamoil-guanidina	300	1,52	0,67	3,40
(1-metoxi-2-naftoil)guanidina	301	1,54	0,25	0,50
(3-metoxi-2-naftoil)guanidina	302	1,04	0,42	0,50
(5-bromo-2-naftoil)guanidina	303	0,22	0,00	2,10
(1,4-dimetoxi-2-naftoil)guanidina	304	0,62	0,33	1,90
(6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina	305	0,38	0,00	1,15
(6-metil-2-naftoil)guanidina	306	0,52	0,25	2,53

ES 2 491 217 T3

(5-fenil-2-naftoil)guanidina	307	0,12	0,08	2,40
(5-(tien-2-il)-2-naftoil)guanidina	308	0,45	0,08	2,40
(5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina	309	0,12	0,00	0,00
(5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina	310	0,00	0,00	1,60
(5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina	311	0,42	0,42	1,60
(5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina	312	0,50	0,80	2,25
(5-cloro-2-naftoil)guanidina	313	0,30	1,30	3,00
acetato de (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidinio	314	0,00	3,30	1,60
(5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina	315	0,20	0,30	1,00
(5-(2-clorofenil)-2-naftoil)guanidina	316	0,20	0,80	0,50
(5-(4-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina	317	0,00	0,20	0,40
(5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina	318	2,00	0,30	0,35
(5-(4-((metilsulfonil)amino)fenil)-2-naftoil)guanidina	319	0,00	0,00	0,15

CONTROL POSITIVO DEL ENSAYO

(3-bromocinamoil)guanidina	BIT067	2,88		
5-bromo-2-fluorocinamoilguanidina	BIT124		2,25	
5-(2'-bromofenil)penta-2,4-dienoilguanidina	BIT128			2,87

Bibliografía

VanCott TC, Mascola JR, Loomis-Price LD, Sinangil F, Zitomersky N, McNeil J, Robb ML, Birx DL, Barnett S. (1999) J. Virol. 73(6): 4640-50

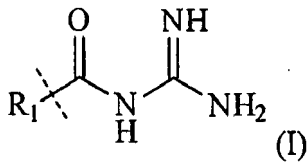
5 Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J y De Clercq E. (1988) J. Virolog. Methods. 20: 309-321

D'Cruz OJ, Shih M-J, Yiv SH, Chen C-L, Uckun FM. (1999) Mol. Hum. Reprod. 5(5): 421-432

Joo, Hong-Gu. (2003) J. Vet. Sci. 4(3): 229-234

REIVINDICACIONES

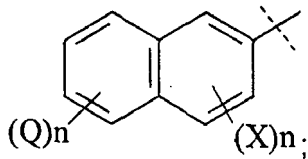
1. Compuesto de fórmula I:



en la que

5

R₁ es



n es 1, 2, 3 ó 4;

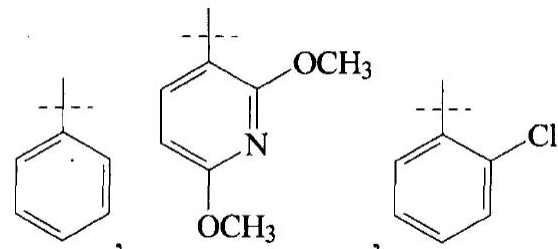
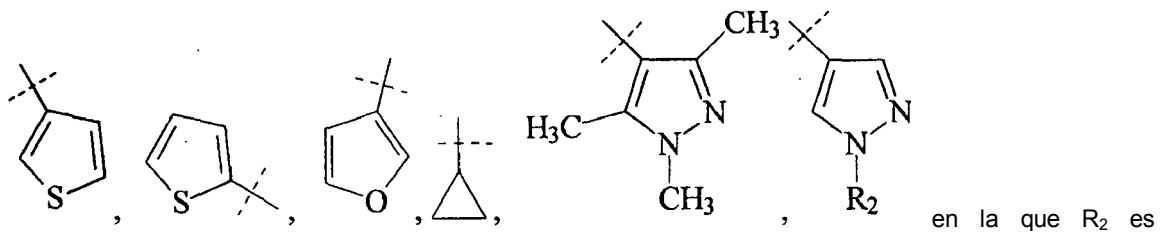
Q se selecciona independientemente de cicloalquilo, tienilo, furilo, pirazolilo, pirazolilo sustituido, piridilo, piridilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido y heterociclo; y

10

X es hidrógeno,

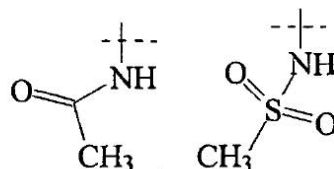
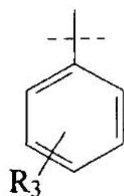
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Q se selecciona independientemente de



alquilo de cadena lineal o ramificada,

y



15

en la que R₃ es

o

3. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

5-tiofen-3-il-2-naftoilguanidina,

5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina,

- (6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-fenil-2-naftoil)guanidina,
 (5-(tien-2-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,
 5 (5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina,
 (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina,
 10 (5-(2-clorofenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(4-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina,
 (5-(4-((metilsulfonyl)amino)fenil)-2-naftoil)guanidina,
 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 15 4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los grupos amina o imina de la parte de guanidilo de los compuestos de fórmula I están presentes como la base libre, un hidrato, una sal orgánica o inorgánica o combinaciones de los mismos.
5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto en forma de una sal, un aducto o está en forma anhídrica o solvatada.
- 20 6. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, opcionalmente en combinación con uno o más portadores o adyuvantes aceptables farmacéuticos.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende además uno o más agentes antivirales conocidos.
- 25 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para su uso en la reducción, el retardo o la inhibición de otro modo del crecimiento y/o la replicación de un virus.
9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para su uso en la prevención de la infección de una célula expuesta a un virus.
- 30 10. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un sujeto expuesto a o infectado por un virus.
- 35 11. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el compuesto o la composición farmacéutica está junto con uno o más agentes antivirales conocidos, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un sujeto expuesto a o infectado por un virus.
12. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en los que el virus se selecciona de las familias de *Lentivirus* y *Flavivirus*.
- 40 13. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en los que el virus se selecciona del grupo que consiste en el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del dengue.
14. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en los que el virus se selecciona del grupo que consiste en VHC, VIH-1, VIH-2 y virus del dengue.
- 45 15. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en los que el sujeto que se somete al tratamiento terapéutico o profiláctico es un mamífero seleccionado del

grupo que consiste en ser humano, primates, animal de ganado, animal de compañía, animal para pruebas de laboratorio o animal salvaje en cautividad.

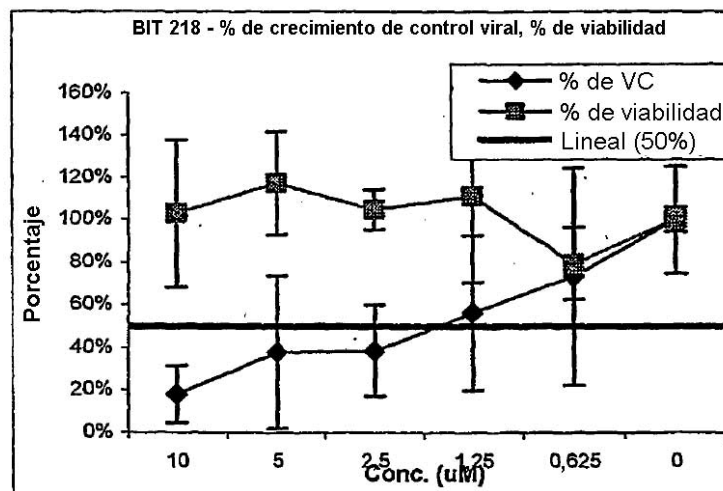
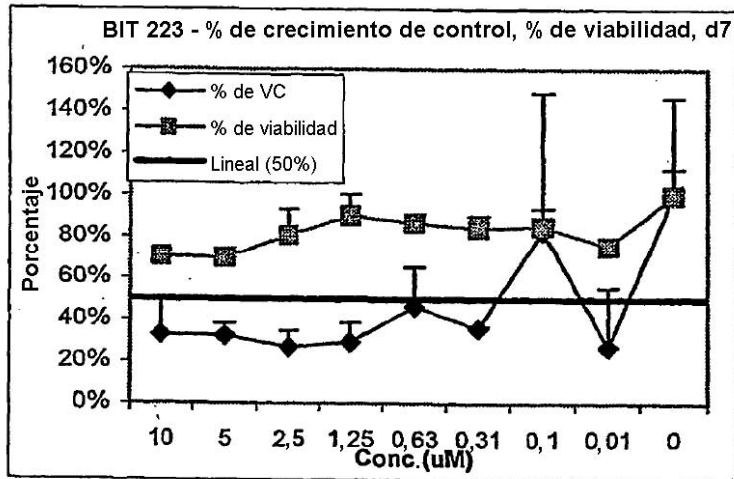
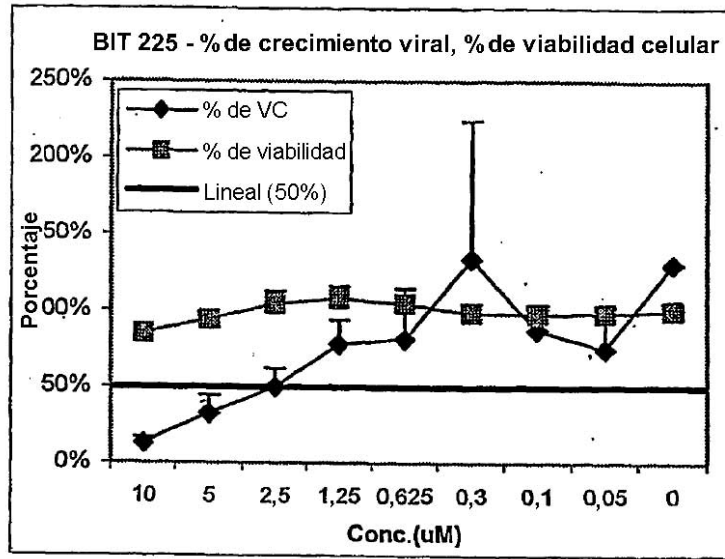


Figura 1

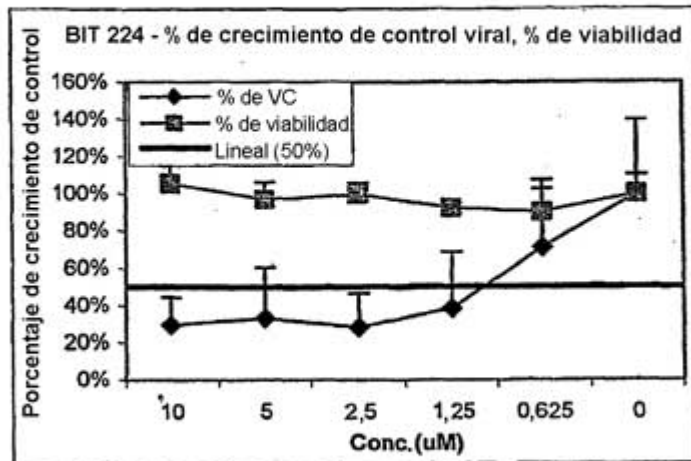
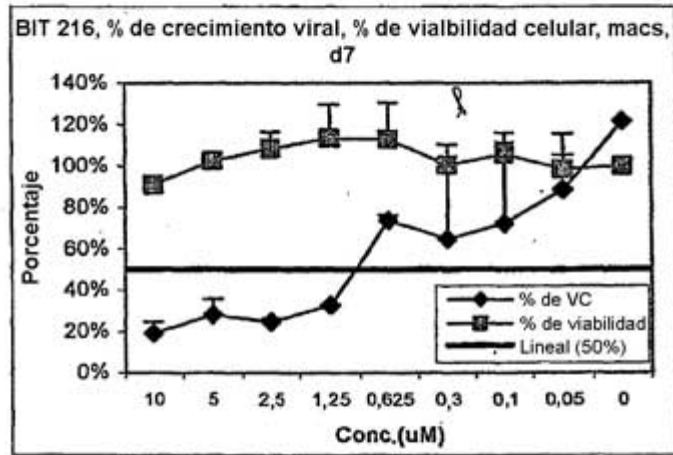
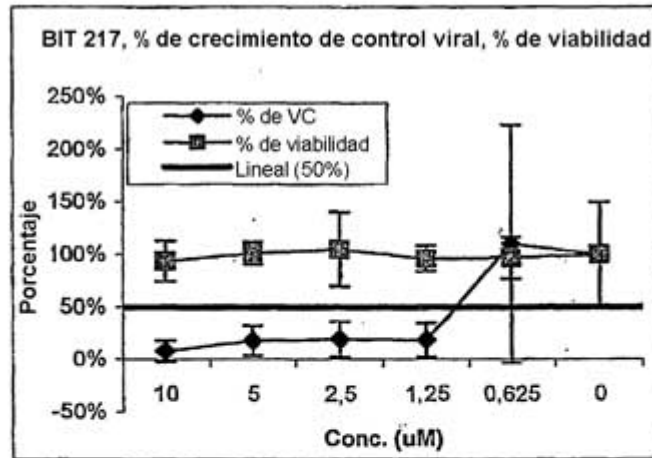


Figura 1 (cont.)

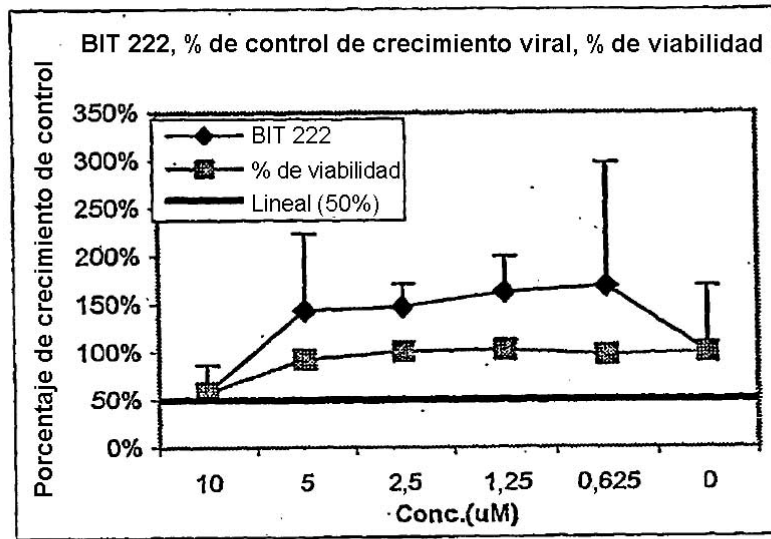


Figura 1 (cont.)

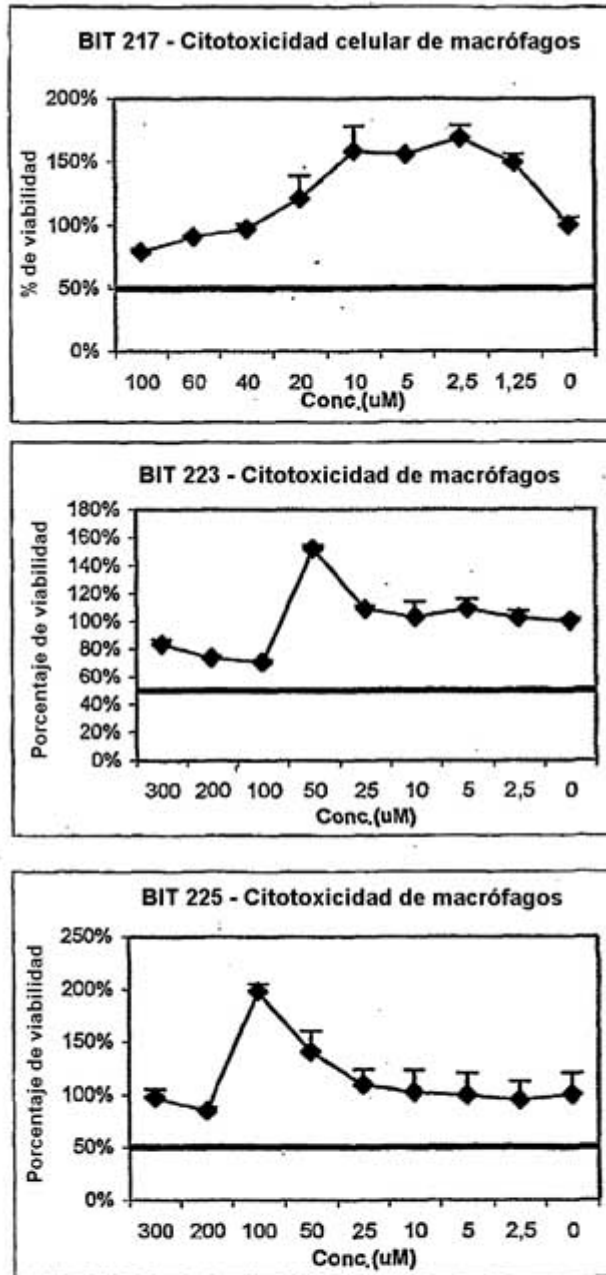


Figura 2

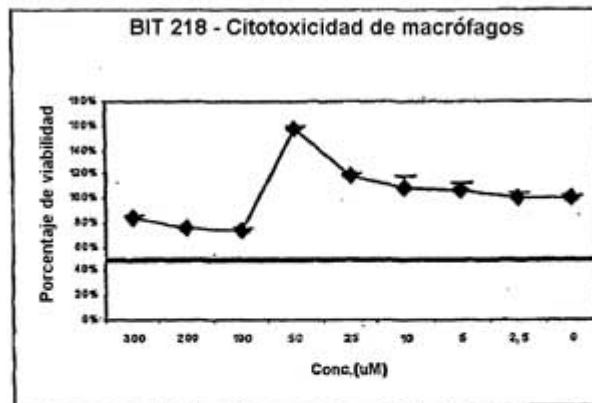
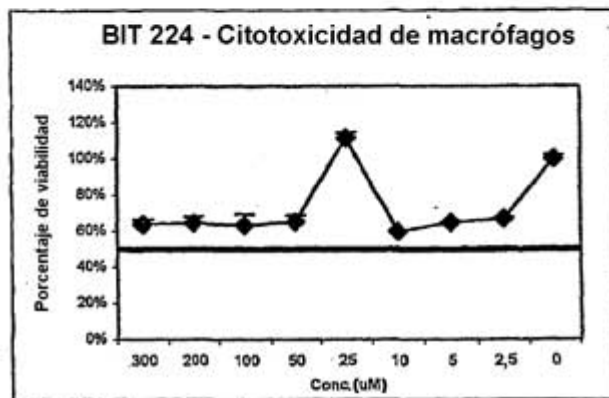
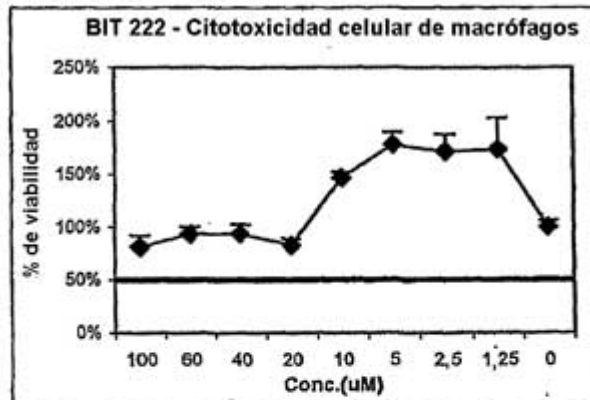


Figura 2 (cont.)

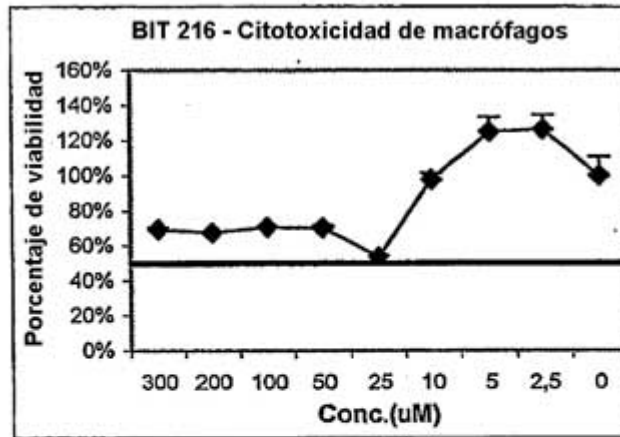


Figura 2 (cont.)