

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 361**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A01N 43/40 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10786885 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2440205**

54 Título: **Iminoazúcares para su uso en el tratamiento de enfermedades por bunyavirus y togavirus**

30 Prioridad:

12.06.2009 US 186614 P

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

05.12.2014

73 Titular/es:

**UNITED THERAPEUTICS CORPORATION (50.0%)
1040 Spring Street
Silver Spring, Maryland 20910, US y
THE CHANCELLOR, MASTERS AND SCHOLARS
OF THE UNIVERSITY OF OXFORD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAMSTEDT, URBAN;
KLOSE, BRENNAN;
ZITZMANN, NICOLE;
DWEK, RAYMOND, A. y
BUTTERS, TERRY, D.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 524 361 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

Iminoazúcares para su uso en el tratamiento de enfermedades por bunyavirus y togavirus

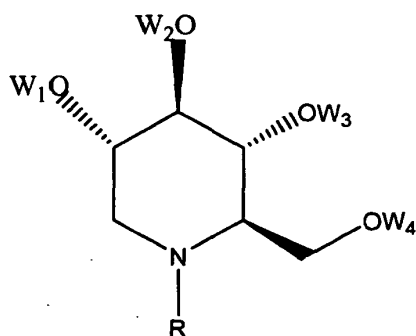
5 **Campo**

La presente solicitud se refiere a iminoazúcares para su uso en un método de tratamiento de enfermedades virales y, en particular, a iminoazúcares para su uso en métodos para el tratamiento y la prevención de enfermedades provocadas por un virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae*.

10

Sumario

Una realización proporciona un compuesto de fórmula,

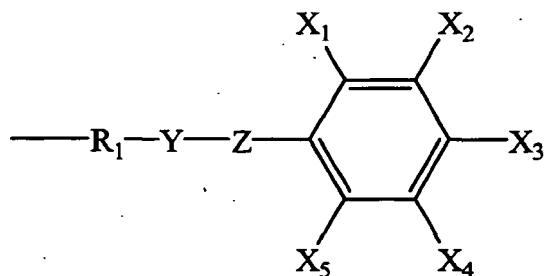


15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad o estado provocado por un virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae*,

20

en la que R o bien se selecciona de grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos arilo sustituidos o no sustituidos o grupos oxaalquilo sustituidos o no sustituidos; o bien en la que R es



25

R₁ es un grupo alquilo sustituido o no sustituido;

X₁₋₅ se seleccionan independientemente de H, NO₂, N₃ o NH₂;

30

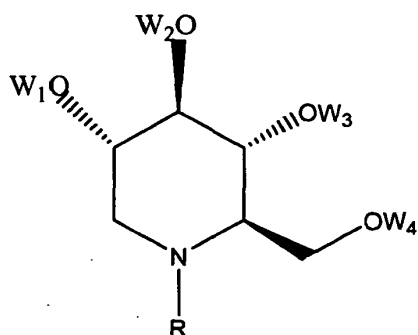
Y está ausente o es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y

Z se selecciona de un enlace o NH; siempre que cuando Z es un enlace, Y está ausente, y siempre que cuando Z es NH, Y es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y

35

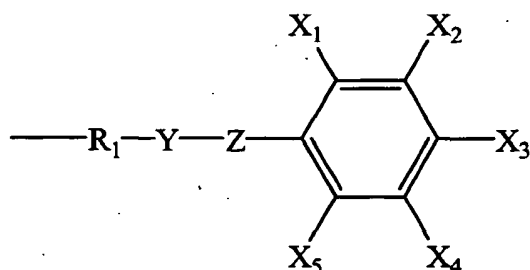
en la que W₁₋₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos haloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos alcanilo sustituidos o no sustituidos, grupos aroilo sustituidos o no sustituidos o grupos haloalcanoilo sustituidos o no sustituidos.

Otra realización proporciona un compuesto de fórmula,



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad o estado provocado por un virus que pertenece a la familia *Togaviridae*,

- 5 en la que R o bien se selecciona de grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos arilo sustituidos o no sustituidos o grupos oxaalquilo sustituidos o no sustituidos; o bien en la que R es



- 10 R₁ es un grupo alquilo sustituido o no sustituido;
 X₁₋₅ se seleccionan independientemente de H, NO₂, N₃ o NH₂;
 15 Y está ausente o es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y
 Z se selecciona de un enlace o NH; siempre que cuando Z es un enlace, Y está ausente, y siempre que cuando Z es NH, Y es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y
 20 en la que W₁₋₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos haloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos alcanilo sustituidos o no sustituidos, grupos aroilo sustituidos o no sustituidos o grupos haloalcanilo sustituidos o no sustituidos.

25 El documento WO 2006/077427 da a conocer una preparación combinada que comprende un modulador de la glucosilación y un inhibidor de la fusión de membranas para su uso combinado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de infecciones provocadas por virus que llevan proteínas de la envuelta glicosiladas.

Dibujos

- 30 Las figuras 1(A)-(E) presentan fórmulas químicas de los siguientes iminoazúcares: A) *N*-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ o UV-1); B) *N*-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ o UV-2); C) *N*-(7-oxadecil)-desoxinojirimicina (N7-O-DNJ o UV-3); D) *N*-(9-metoxinonil)-desoxinojirimicina (N9-DNJ o UV-4); E) *N*-(*N*-(4'-azido-2'-nitrofenil)-6-aminohexil)-desoxinojirimicina (NAP-DNJ o UV-5).

- 35 La figura 2 es un esquema de síntesis para NN-DNJ.

Las figuras 3A-D ilustran la síntesis de N7-O-DNJ. En particular, la figura 3A muestra una secuencia de reacciones que conducen a N7-O-DNJ; la figura 3B ilustra la preparación de 6-propiloxi-1-hexanol; la figura 3C ilustra la preparación de 6-propiloxi-1-hexanal; la figura 3D ilustra la síntesis de N7-O-DNJ.

- 40 Las figuras 4A-C se refieren a la síntesis de *N*-(9-metoxinonil)-desoxinojirimicina. En particular, la figura 4A ilustra la preparación de 9-metoxi-1-nonanol; la figura 4B ilustra la preparación de 9-metoxi-1-nonanal; la figura 4C ilustra la síntesis de *N*-(9-metoxinonil)-desoxinojirimicina.

- 45 La figura 5 presenta una tabla con datos de CI₅₀ (μm) *in vitro* para NB-DNJ; NN-DNJ; N7-O-DNJ; N9-DNJ y NAP-DNJ frente a bunyavirus (virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV)) y togavirus (virus de la encefalitis equina

venezolana (VEEV)) y virus Chikungunya (CHIKV)) seleccionados.

La figura 6 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV).

5 La figura 7 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).

La figura 8 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus Chikungunya (CHIKV).

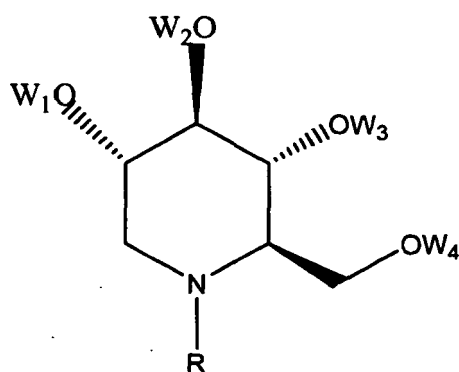
Descripción detallada

- 10 Definición de términos
- A menos que se especifique lo contrario, “un” o “uno/una” significa “uno/una o más.”
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “infección viral” describe un estado patológico, en el que un virus invade una célula sana, usa la maquinaria reproductora de la célula para multiplicarse o replicarse y por último lisa la célula dando como resultado muerte celular, liberación de partículas virales y la infección de otras células por los viriones recién producidos. Una infección latente por determinados virus también es un posible resultado de la infección viral.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento o prevención de una infección viral” significa inhibir la replicación del virus particular, inhibir la transmisión viral o prevenir que el virus se establezca por sí mismo en su huésped, y mejorar o aliviar los síntomas de la enfermedad provocada por la infección viral. El tratamiento se considera terapéutico si existe una reducción en la carga viral, disminución en la mortalidad y/o morbilidad.
- 25 CI_{50} o CI_{90} (concentración inhibitoria 50 ó 90) es una concentración de un agente terapéutico, tal como un iminoazúcar, usada para conseguir el 50% o el 90% de reducción de la carga viral, respectivamente.
- 30 Descripción
- Los presentes inventores descubrieron que determinados iminoazúcares, tales como derivados de desoxinójirimicina, pueden ser eficaces frente a virus que pertenecen a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae* y, por tanto, estos iminoazúcares pueden ser útiles para tratar o prevenir una enfermedad o estado provocado por un virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae*.
- 35 La familia *Bunyaviridae* contiene los siguientes géneros: género *Hantavirus*; género *Nairovirus*; género *Orthobunyavirus*; género *Phlebovirus*; género *Tospovirus*; género *Tenuivirus*. De estos géneros, todos pueden infectar a vertebrados excepto los tospovirus, que sólo pueden infectar a artrópodos y plantas.
- 40 El género *Hantavirus* incluye los siguientes virus: virus Andes (ANDV); virus Bayou (BAYV); virus Black Creek Canal (BCCV); virus Cano Delgadito (CADV); virus Choclo (CHOV); virus Dobrava-Belgrade (DOBV); virus Hantaan (HNTV); virus Isla Vista (ISLAV); virus Khabarovsk (KHAV); virus Laguna Negra (LANV); virus Muleshoe (MULV); virus New York (NYV); virus Prospect Hill (PHV); virus Puumala (PMV); virus Rio Mamore (RIOMV); virus Rio Segundo (RIOSV); virus Seoul (SEOV); virus Sin Nombre (SNV); virus Thailand (THAIV); Thottapalayam (TPMV);
- 45 virus Topografov (TOPV); virus Tula (TULV); virus Bakau.
- El género *Nairovirus* incluye los siguientes virus: virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; virus Dugbe; virus Qalyub; virus Sakhalin; Dera Ghazi Khan; virus Thiafora; y virus Hughes.
- 50 El género *Orthobunyavirus* incluye virus La Crosse; virus de la encefalitis californiana y virus Jamestown Canyon.
- El género *Phlebovirus* incluye virus Alenquer, virus Candiru, virus Chagres, virus Nápoles de la fiebre de las moscas de arena, virus siciliano de la fiebre de las moscas de arena, virus Toscana de la fiebre de las moscas de arena, virus de la fiebre del valle del Rift y virus Punta Toro.
- 55 Las enfermedades y estados que pueden estar provocadas por virus que pertenecen a la familia *Bunyaviridae* incluyen, pero no se limitan a, infección por Hantavirus; fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), que puede estar provocada por un virus del género *Hantavirus*, tal como virus Hantaan, virus Puumala, virus Seoul y virus Dobrava; síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH o SPH), que puede estar provocado por un virus del género *Hantavirus*, tal como virus Sin Nombre, virus Andes, virus New York, virus Bayou y virus Black Creek Canal; nefropatía epidémica, que puede estar provocada por virus Puumala; fiebre hemorrágica provocada por virus Seoul; enfermedad del sudor; fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; encefalitis de La Crosse; encefalitis californiana, que pueden estar provocada por un virus del género *Orthobunyavirus*, tal como virus La Crosse, virus de la encefalitis californiana y virus Jamestown Canyon; fiebre por flebotomos; y fiebre del valle del Rift.
- 60
- 65 La familia *Togaviridae* incluye el género *Alphavirus* y el género *Rubivirus*.

El género *Alphavirus* incluye los siguientes virus: virus Sindbis; virus del bosque Semliki; virus O'nyong'nyong; virus Chikungunya; virus Mayaro; virus del río Ross; virus del bosque Barmah; virus de la encefalitis equina del este; virus de la encefalitis equina del oeste; y virus de la encefalitis equina venezolana. El género *Rubivirus* incluye virus de la rubeola.

Las enfermedades y estados que pueden estar provocados por virus que pertenecen a la familia *Togaviridae* incluyen, pero no se limitan a, fiebre Sindbis; fiebre O'nyong'nyong; enfermedad de Chikungunya; fiebre del río Ross; infección por virus del bosque Barmah; encefalitis equina del este; encefalitis equina del oeste; encefalitis equina venezolana y rubeola.

El iminoazúcar puede ser un compuesto de la siguiente fórmula:



en la que W_{1-4} se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos haloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos alcanilo sustituidos o no sustituidos, grupos aroilo sustituidos o no sustituidos o grupos haloalcanilo sustituidos o no sustituidos.

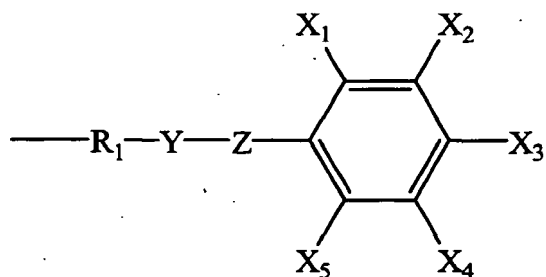
En algunas realizaciones, R puede seleccionarse de grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos aroilo sustituidos o no sustituidos o grupos oxaalquilo sustituidos o no sustituidos.

En algunas realizaciones, R puede ser grupos alquilo sustituidos o no sustituidos y/o grupos oxaalquilo sustituidos o no sustituidos, comprender desde 1 hasta 16 átomos de carbono, desde 4 hasta 12 átomos de carbono o desde 8 hasta 10 átomos de carbono. El término "oxaalquilo" se refiere a un derivado de alquilo, que puede contener desde 1 hasta 5 o desde 1 hasta 3 o desde 1 hasta 2 átomos de oxígeno. El término "oxaalquilo" incluye derivados de alquilo terminados en hidroxilo y terminados en metoxilo.

En algunas realizaciones, R puede seleccionarse de, pero no se limita a $-(CH_2)_6OCH_3$, $-(CH_2)_6OCH_2CH_3$, $-(CH_2)_6O(CH_2)_2CH_3$, $-(CH_2)_6O(CH_2)_3CH_3$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_5CH_3$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_6CH_3$ y $-(CH_2)_2O(CH_2)_7CH_3$.

En algunas realizaciones, R puede ser un grupo alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo de cadena larga, que puede ser un grupo alquilo C_6-C_{20} ; un grupo alquilo C_8-C_{16} ; o un grupo alquilo C_8-C_{10} .

En algunas realizaciones, R puede tener la siguiente fórmula



, en la que R_1 es un grupo alquilo sustituido o no sustituido;

X_{1-5} se seleccionan independientemente de H, NO_2 , N_3 o NH_2 ;

Y está ausente o es un grupo alquilo C_1 sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y

Z se selecciona de un enlace o NH; siempre que cuando Z es un enlace, Y está ausente, y siempre que cuando Z es NH, Y es un grupo alquilo C_1 sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo.

En algunas realizaciones, Z es NH y R₁-Y es un grupo alquilo sustituido o no sustituido, tal como un grupo alquilo C₂-C₂₀ o un grupo alquilo C₄-C₁₂ o un grupo alquilo C₄-C₁₀.

5 En algunas realizaciones, X₁ es NO₂ y X₃ es N₃. En algunas realizaciones, cada uno de X₂, X₄ y X₅ es hidrógeno.

En algunas realizaciones, el iminoazúcar es un derivado de DNJ dado a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0275998.

10 En algunas realizaciones, el derivado de desoxinójirimicina puede ser uno de los compuestos presentados en la figura 1.

Se dan a conocer métodos de síntesis de derivados de desoxinójirimicina, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.622.972, 5.200.523, 5.043.273, 4.994.572, 4.246.345, 4.266.025, 4.405.714 y 4.806.650 y en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0275998.

En algunas realizaciones, el iminoazúcar puede estar en forma de una sal derivada de un ácido inorgánico u orgánico. Se dan a conocer sales farmacéuticamente aceptables y métodos para preparar formas de sal, por ejemplo, en Berge *et al.* (*J. Pharm. Sci.* 66: 1-18, 1977). Los ejemplos de sales apropiadas incluyen pero no se limitan a las siguientes sales: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato y undecanoato.

En algunas realizaciones, el iminoazúcar también puede usarse en forma de un profármaco. En las patentes estadounidenses n.ºs 5.043.273 y 5.103.008 se dan a conocer profármacos de derivados de DNJ, tales como los derivados de DNJ 6-fosforilados.

En algunas realizaciones, el iminoazúcar puede usarse como parte de una composición que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable y/o un componente útil para administrar la composición a un animal. Se conocen en la técnica numerosos portadores farmacéuticamente aceptables útiles para administrar las composiciones a un ser humano y componentes útiles para administrar la composición a otros animales tales como ganado. La adición de tales portadores y componentes a la composición de la invención se encuentra bien dentro del nivel de experiencia en la técnica.

En algunas realizaciones, el iminoazúcar puede usarse en una composición de liposomas, tal como las dadas a conocer en la publicación estadounidense 2008/0138351; la solicitud estadounidense n.º 12/410.750 presentada el 25 de marzo del 2009 y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/202.699 presentada el 27 de marzo del 2009.

El iminoazúcar, tal como un derivado de DNJ, puede administrarse a una célula o un animal afectado por un virus. El iminoazúcar puede inhibir la morfogénesis del virus o puede tratar al animal. El tratamiento puede reducir, mitigar o disminuir la infección por el virus en el animal.

Los animales que pueden infectarse con un virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae* incluyen vertebrados, tales como aves y mamíferos incluyendo primates, seres humanos, roedores, ganado, tales como ovejas y cabras, y equinos tales como caballos, cebras y asnos, así como invertebrados.

La cantidad de iminoazúcar administrada a una célula o un animal puede ser una cantidad eficaz para inhibir la morfogénesis de un virus, que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae*. El término "inhibir" tal como se usa en el presente documento, puede referirse a la eliminación y/o reducción detectable de una actividad biológica presentada en ausencia del iminoazúcar. El término "cantidad eficaz" puede referirse a la cantidad del iminoazúcar necesaria para conseguir el efecto indicado. El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento puede referirse a reducir o aliviar los síntomas en un sujeto, prevenir que los síntomas empeoren o progresen, la inhibición o eliminación del agente causante o la prevención de la infección o el trastorno relacionado con el virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae* en un sujeto que está libre del mismo.

Por tanto, por ejemplo, el tratamiento de la enfermedad provocada por un virus puede incluir la destrucción del agente infeccioso, la inhibición de o la interferencia con su crecimiento o maduración, y la neutralización de sus efectos patológicos. La cantidad del iminoazúcar que puede administrarse a la célula o animal es preferiblemente una cantidad que no induce ningún efecto tóxico que sea mayor que las ventajas que acompañan a su administración.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar para administrar una cantidad del/de los compuesto(s) activo(s) que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica

deseada para un paciente particular.

El nivel de dosis seleccionado puede depender de la actividad del iminoazúcar, la vía de administración, la gravedad del estado que está tratándose y el estado e historia clínica anterior del paciente que está tratándose. Sin embargo, se encuentra dentro de la técnica comenzar las dosis del/de los compuesto(s) a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en dosis múltiples para fines de administración, por ejemplo, de dos a cuatro dosis al día. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo el peso corporal, la salud general, la dieta, el momento y la vía de administración y la combinación con otros agentes terapéuticos y la gravedad del estado o enfermedad que está tratándose. La dosificación diaria para un ser humano adulto puede oscilar entre aproximadamente un microgramo y aproximadamente un gramo o entre aproximadamente 10 mg y 100 mg del iminoazúcar por 10 kilogramos de peso corporal. Naturalmente, la cantidad del iminoazúcar que debe administrarse a una célula o un animal puede depender de numerosos factores que un experto en la técnica entiende bien, tales como el peso molecular del iminoazúcar y la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la presente descripción pueden administrarse por vía sistémica en formulaciones sólidas orales, formulaciones oftálmicas, de supositorios, de aerosol, tópicas u otras similares. Por ejemplo, pueden estar en la forma física de un polvo, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, un gel, una disolución, una suspensión, un jarabe o similar. Además del iminoazúcar, tales composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables y otros principios que se sabe que potencian y facilitan la administración de fármacos. También pueden usarse otras posibles formulaciones, tales como nanopartículas, liposomas, eritrocitos resellados y sistemas basados en inmunología para administrar el iminoazúcar. Tales composiciones farmacéuticas pueden administrarse por varias vías. El término "parenteral" usado en el presente documento incluye técnicas subcutáneas, intravenosas, intrarteriales, intratecales y de inyección e infusión, sin limitación. A modo de ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral, por vía sistémica o por una vía pulmonar.

Estas composiciones pueden administrarse en una dosis única o en dosis múltiples que se administran en diferentes momentos. Dado que puede persistir el efecto inhibitorio de la composición sobre un virus, que pertenece a la familia *Bunyaviridae* o *Togaviridae*, el régimen de dosificación puede ajustarse de manera que se retarda la propagación del virus a la vez que se afecta mínimamente a la célula huésped. A modo de ejemplo, se le puede administrar a un animal una dosis de la composición de la invención una vez a la semana, mediante lo cual se retarda la propagación del virus durante toda la semana, a la vez que se inhiben las funciones de la célula huésped sólo durante un corto periodo una vez a la semana.

Las realizaciones descritas en el presente documento se ilustran adicionalmente mediante, aunque sin limitarse de ninguna manera a, los siguiente ejemplos de trabajo.

40 Ejemplos de trabajo

1. Síntesis de N-nonil-DNJ

Tabla 1. Materiales para la síntesis de NN-DNJ

45

Nombre	Cantidad
DNJ	500 mg
Nonanal	530 mg
Etanol	100 ml
AcOH	0,5 ml
Pd/C	500 mg

Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 50 ml equipado con un agitador magnético con DNJ (500 mg), etanol (100 ml), nonanal (530 mg) y ácido acético (0,5 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción hasta 40-45°C y se agitó durante 30-40 minutos bajo nitrógeno. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiental y se añadió Pd/C. Se evacuó el matraz de reacción y se reemplazó por gas hidrógeno en un balón. Se repitió este procedimiento tres veces. Finalmente, se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite y se lavó con etanol. Se concentró el filtrado a vacío para obtener el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice de 230-400 de malla). Se usó un gradiente de disolvente de metanol en diclorometano (al 10-25%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto deseado y se concentraron a vacío para dar el producto puro (420 mg). Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando una placa de gel de sílice de capa fina; eluyente; metanol:diclorometano = 1:2.

2. Síntesis de N-7-oxadecil-DNJ

2a. Síntesis de 6-propiloxi-1-hexanol

5 Tabla 2. Materiales para la síntesis de 6-propiloxi-1-hexanol

Nombre	Cantidad
1,6-Hexanodiol	6,00 g
1-Yodopropano	8,63 g
terc-Butóxido de potasio	5,413 mg
THF	140 ml

Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 500 ml equipado con un agitador magnético con 1,6-hexanodiol (6,00 g), terc-butóxido de potasio (5,413 g) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción durante una hora y entonces se añadió 1-yodopropano (8,63 g). Se calentó la mezcla de reacción hasta 70-80°C y se agitó durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Tras la finalización de la reacción, se añadió agua a la mezcla de reacción y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Se concentraron las fases orgánicas combinadas a vacío para obtener el producto en bruto. Se disolvió el producto en bruto en diclorometano y se lavó con agua, y luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio. Se concentró la fase orgánica a vacío para obtener el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna usando gel de sílice de 230-400 de malla. Se usó un gradiente de disolvente de acetato de etilo en hexanos (al 10-45%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto puro deseado y se concentraron a vacío para dar 6-propiloxi-1-hexanol puro (lote D-1029-048, 1,9 g, 25%). Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF); (eluyente: acetato de etilo al 60% en hexanos).

2b. Preparación de 6-propiloxi-1-hexanal

25 Tabla 3. Materiales para la preparación de 6-propiloxi-1-hexanal

Nombre	Cantidad
6-Propiloxi-1-hexanol	1,00 g
PDC	4,70 g
Celite	1,00 g
NaOAc	100 mg
CH ₂ Cl ₂	10 ml

Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 50 ml equipado con un agitador magnético con 6-propiloxi-1-hexanol (1,0 g), PDC (4,7 g), diclorometano (10 ml), Celite (1,0 g) y acetato de sodio (100 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 5 minutos. Se añadió PDC (4,70 g) a la mezcla de reacción y se agitó durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Tras la finalización de la reacción, se cargó directamente la mezcla de reacción en la columna (gel de sílice de 230-400 de malla). Se usó un gradiente de disolvente de diclorometano en acetato de etilo (al 10-20%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto puro deseado y se concentraron a vacío para dar 6-propiloxi-1-hexanal puro (lote D-1029-050, 710 mg, 71%). Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF); (eluyente: acetato de etilo al 60% en hexanos).

2c Síntesis de N-7-oxadecil-DNJ

40 Tabla 4. Materiales para la síntesis de N-7-oxadecil-DNJ

Nombre	Cantidad
DNJ	500 mg
6-Propiloxi-1-hexanal	585 mg
Pd/C	125 mg
Etanol	15 ml
Ácido acético	0,1 ml

Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 50 ml equipado con un agitador magnético con DNJ (500 mg), etanol (15 ml), 6-propiloxi-1-hexanal (585 mg) y ácido acético (0,1 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción hasta 40-45°C y se agitó durante 30-40 minutos bajo nitrógeno. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiental y se añadió Pd/C. Se evacuó el matraz de reacción y se reemplazó por gas hidrógeno en un balón. Se repitió este procedimiento tres veces. Finalmente, se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Se

filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite y se lavó con etanol. Se concentró el filtrado a vacío para obtener el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice de 230-400 de malla). Se usó un gradiente de disolvente de metanol en diclorometano (al 10-40%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto deseado y se concentraron a vacío para dar el producto puro. (Lote: D-1029-052 (840 mg)). Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF); (eluyente: metanol al 50% en diclorometano).

3. Síntesis de N-(9-metoxi)-nonil-DNJ

10 3a Preparación de 9-metoxi-1-nonanol

Tabla 5. Materiales para la preparación de 9-metoxi-1-nonanol

Nombre	Cantidad
1,9-Nonanodiol	10,0 g
Sulfato de dimetilo	41,39 g
Hidróxido de sodio	5,0 g
DMSO	100 ml

15 Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 500 ml equipado con un agitador magnético y una barra agitadora con 1,9-nonanodiol (10,00 g, 62,3 mmol) en dimetilsulfóxido (100 ml) y H₂O (100 ml). A esto se le añadió lentamente una disolución de hidróxido de sodio (5,0 g, 125,0 mmol) en H₂O (10 ml) a temperatura ambiente. Durante la adición de hidróxido de sodio, la mezcla de reacción generó calor y la temperatura se elevó hasta ~40°C. Se agitó la mezcla durante una hora, y entonces se añadió sulfato de dimetilo (16,52 g, 131 mmol) en
 20 cuatro porciones mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción a ~40°C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). La monitorización mediante CCF indicó que la conversión de la reacción era del 25%. En esta fase se añadió sulfato de dimetilo adicional (24,78 g, 196,44 mmol) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 h adicionales. Tras la finalización de la reacción, se añadió hidróxido de sodio (disolución al
 25 10% en agua) a la mezcla de reacción para ajustar el pH de la disolución a 11-13. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h y se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (200 ml), salmuera (150 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (20 g), se filtraron y se concentraron a vacío para obtener un producto en bruto (14 g). Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna usando gel de sílice de 250-400 de malla. Se usó un gradiente de disolvente de acetato de etilo en hexanos (al 10-
 30 50%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto puro deseado y se concentraron a vacío para dar 9-metoxi-1-nonanol puro (lote D-1027-155, 2,38 g, 21,9%). Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando una placa de gel de sílice de capa fina; eluyente: acetato de etilo al 60% en hexanos.

35 3b Preparación de 9-metoxi-1-nonanal

Tabla 6. Materiales para la preparación de 9-metoxi-1-nonanal

Nombre	Cantidad
9-Metoxi-1-nonanol	1,0 g
PDC	4,7 g
Tamices moleculares, 3A	1,0 g
NaOAc	0,1 g
CH ₂ Cl ₂	10 ml

40 Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de una boca, de 50 ml equipado con un agitador magnético y una barra agitadora con 9-metoxi-nonanol (1,0 g, 5,9 mmol), diclorometano (10 ml), tamices moleculares (1,0 g, 3A), acetato de sodio (0,1 g) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 5 minutos. Se cargó la mezcla de reacción con dicromato de piridinio (4,7 g, 12,5 mmol) y se agitó
 45 durante la noche. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Tras la finalización de la reacción, se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de gel de sílice (~15 g). Se evaporó el filtrado a vacío para obtener un compuesto en bruto. Se purificó éste mediante cromatografía en columna usando una columna de gel de sílice (250-400 de malla, 40 g). Se usó un gradiente de disolvente de acetato de etilo en hexano (al 10-50%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto puro deseado y se concentraron a vacío para dar 9-metoxi-nonanal puro (lote D-1027-156, 553 mg, 54,4%). Se monitorizó la
 50 finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando una placa de gel de sílice de capa fina; eluyente: acetato de etilo al 60% en hexanos.

3c Síntesis de N-(9-metoxi)-nonil-DNJ

Tabla 7. Materiales para la síntesis de N-(9-metoxi)-nonil-DNJ

Nombre	Cantidad
DNJ	300 mg
9-metoxi-1-nonanal	476 mg
Pd/C	200 mg
Etanol	20 ml

Procedimiento: Se cargó un matraz de fondo redondo, de dos cuellos, de 50 ml equipado con un agitador magnético y una barra agitadora con DNJ (300 mg, 1,84 mmol), etanol (20 ml), 9-metoxi-1-nonanal (476 mg, 2,76 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción durante 5-10 minutos bajo nitrógeno y se añadió Pd/C a temperatura ambiente. Se evacuó la mezcla de reacción y se reemplazó por gas hidrógeno usando un balón. Se repitió este procedimiento tres veces y entonces se agitó la mezcla de reacción bajo hidrógeno atmosférico a temperatura ambiente. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (observación 1). Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite y se lavó con etanol (20 ml). Se concentró el filtrado a vacío para obtener un producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna usando gel de sílice de 250-400 de malla (20 g). Se usó un gradiente de disolvente de metanol en acetato de etilo (al 5-25%) para eluir el producto de la columna. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto puro deseado y se concentraron a vacío para dar un sólido blanquecino. Se trituró el sólido en acetato de etilo (20 ml), se filtró y se secó a alto vacío para dar un sólido blanco [lote: D-1027-158 (165,3 mg, 28,1%)]. Se monitorizó la finalización de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando una placa de gel de sílice de capa fina; eluyente: metanol al 50% en diclorometano.

4. Inhibición de bunyavirus y togavirus seleccionados

La figura 5 presenta una tabla con datos de CI_{50} (μM) *in vitro* para NB-DNJ; NN-DNJ; N7-O-DNJ; N9-DNJ y NAP-DNJ frente al virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV), que es un bunyavirus, y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y el virus Chikungunya (CHIKV), que son togavirus.

Compuestos. Se prepararon disoluciones madre base de los siguientes compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración en DMSO máxima final del 0,5%: NB-DNJ, NN-DNJ, N7-O-DNJ, N9-DNJ y NAP-DNJ. Se diluyeron todos los compuestos a partir de las disoluciones madre base hasta sus concentraciones experimentales.

Virus. Se examinaron los compuestos para determinar la inhibición frente a la cepa MP12 del virus de la fiebre del valle del Rift (bunyavirus), la cepa 181/25 de Chikungunya (*Togaviridae*) y la cepa TC-83 de la encefalitis equina venezolana (*Togaviridae*). Se prepararon soluciones madre virales mediante propagación en células Vero usando medio Eagle modificado (MEM, Sigma), complementado con suero bovino fetal al 2%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 ug/ml y se titularon usando el ensayo de placas de lisis convencional (método presentado a continuación). Se almacenaron las disoluciones madre virales a -80°C hasta su uso.

Ensayo de reducción del rendimiento de virus. Se realizó el ensayo de rendimiento de virus mediante ensayo de placas de lisis convencional sobre muestras de sobrenadante generadas a partir de células infectadas con virus, incubadas con diferentes concentraciones del compuesto UV. Se sembraron placas de cultivo celular de 24 pocillos con células en 1 ml de MEM con células Vero con suero bovino fetal al 10% (ATCC, Manassas, VA; número de ATCC CCL-81) en MEM con sales de Earl (Sigma, St Louis, MO) complementado con L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomycinina 100 U/ml y suero bovino fetal inactivado por calor al 2% y se incubaron a 37°C durante 24 horas o hasta ~80% de confluencia. Se reemplazó el medio por medio complementado con suero bovino fetal al 2% y las concentraciones de los compuestos que iban a usarse comenzaron a 250 μM (o 125 μM) y se sometieron a prueba por triplicado usando 8 diluciones. Se añadieron compuestos comenzando a una dilución de 250 o 125 μM a un pocillo apropiado y se incubaron durante 1 h a 37°C , el 5% de CO_2 . Tras 1 h de incubación se añade el virus a cada pocillo. Se requirieron cuatro días para la infección por RVFV, tres días para CHIKV y dos días para el virus de la EEV. Tras la finalización de la infección, se cosechó el sobrenadante y se recogió en tubos de MCF de 0,5 ml para la titulación.

Para titular MP12 de RVFV, 181/25 de CHIKV y TC-83 de la EEV, se usaron placas de 12 pocillos con células Vero confluentes al 80% en medio de crecimiento. Se diluyó el sobrenadante viral desde 10^{-3} hasta 10^{-8} y se añadió (100 μl) a las células y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación cada 5-10 minutos. Se aspiró el medio de infección viral (100 μl) y se reemplazó con 1 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 2% precalentada, mezclada 1:1 con 2X MEM (suero de ternero fetal al 5%) y se incubó a 37°C , el 5% de CO_2 durante 6 días, seguido por visualización de placas de lisis mediante tinción con rojo neutro. Se determinó la CI_{50} como la concentración de compuesto que daba como resultado el 50% de inhibición del virus.

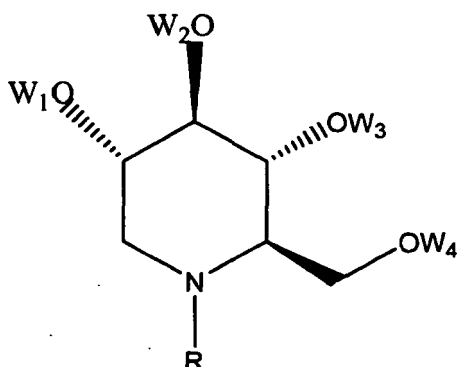
La figura 6 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV). Se realizó el ensayo de rendimiento de virus tal como se dio a conocer para la figura 5. Se encontró inhibición del virus MP12 de RVFV para los compuestos UV-2 (NN-DNJ), -3 (N7-O-DNJ) y -5 (NAP-DNJ) con CE_{50} de 58, 218 y 49 μM . UV-2 era

tóxico a las células a la concentración más alta (250 μM). Los compuestos UV-1 (NB-DNJ) y -4 (N9-DNJ) tenían todos CE_{50} superiores a 250 μM .

- 5 La figura 7 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). Se realizó el ensayo de rendimiento de virus tal como se dio a conocer anteriormente para la figura 5. Se encontró inhibición del virus de la EEV para los compuestos UV-1 (NB-DNJ), -2 (NN-DNJ) y -5 (NAP-DNJ) con CE_{50} de 156, 12 y 2 μM . UV-2 era tóxico a la concentración más alta (250 μM). Los compuestos UV-3 (N7-O-DNJ) y -4 (N9-DNJ) tenían todos CE_{50} superiores a 250 μM .
- 10 La figura 8 presenta curvas de dosis-respuesta para el virus Chikungunya (CHIKV). Se realizó el ensayo de rendimiento de virus como en la figura 5. Se encontró inhibición del virus Chikungunya para los compuestos UV-5 (NAP-DNJ) con una CE_{50} de 22 μM . UV-2 (NN-DNJ) mostró protección con una CE_{50} de 56 μM . Los compuestos UV-1 (NB-DNJ), -3 (N7-O-DNJ), -4 (N9-DNJ) tenían todos CE_{50} superiores a 500 μM .

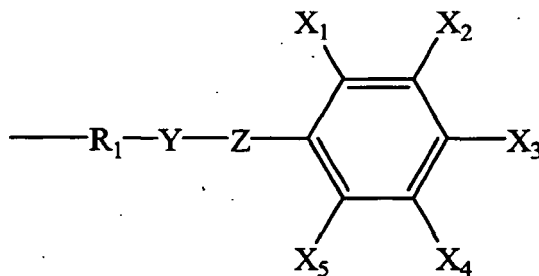
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad o estado provocado por un virus que pertenece a la familia *Togaviridae* o la familia *Bunyaviridae*,

en la que R o bien se selecciona de grupos oxaalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo sustituidos o no sustituidos o grupos arilo sustituidos o no sustituidos; o bien en la que R es:



en la que,

R₁ es un grupo alquilo sustituido o no sustituido;

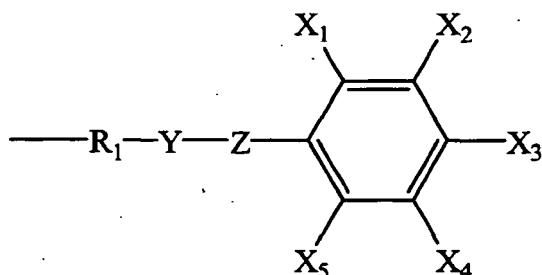
X₁₋₅ se seleccionan independientemente de H, NO₂, N₃ o NH₂;

Y está ausente o es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y

Z se selecciona de un enlace o NH; siempre que cuando Z es un enlace, Y está ausente, y siempre que cuando Z es NH, Y es un grupo alquilo C₁ sustituido o no sustituido, distinto de carbonilo; y

en la que W₁₋₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos haloalquilo sustituidos o no sustituidos, grupos alcanóilo sustituidos o no sustituidos, grupos aroílo sustituidos o no sustituidos o grupos haloalcanóilo sustituidos o no sustituidos.

2. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que R es un grupo oxaalquilo o alquilo que comprende de 1 a 16 átomos de carbono.
3. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 2, en el que R es un grupo alquilo C₈-C₁₆ y cada uno de W₁₋₄ es hidrógeno.
4. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que el compuesto es N-(9-metoxinonil)-desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, N-(7-oxadecil)-desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o N-nonil-desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
5. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que R es:



- 5 6. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 5, en el que cada uno de W₁₋₄ es hidrógeno.
7. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 5, en el que X₁ es NO₂ y X₃ es N₃.
- 10 8. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 5, en el que cada uno de X₂, X₄ y X₅ es hidrógeno.
- 15 9. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 5, en el que el compuesto es N-(N-{4'-azido-2'-nitrofenil}-6-aminohehexil)-desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 20 10. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que el virus pertenece al género *Alphavirus* o género *Phlebovirus*.
- 25 11. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que el virus se selecciona de virus de la encefalitis equina venezolana; virus Sindbis; virus del bosque Semliki; virus O'nyong'nyong; virus Chikungunya; virus Mayaro; virus del río Ross; virus del bosque Barmah; virus de la encefalitis equina del este; virus de la encefalitis equina del oeste y virus de la rubeola.
- 30 12. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o estado se selecciona de encefalitis equina venezolana; fiebre Sindbis; fiebre O'nyong'nyong; enfermedad de Chikungunya; fiebre del río Ross; infección por virus del bosque Barmah; encefalitis equina del este; encefalitis equina del oeste y rubeola.
- 35 13. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que el virus se selecciona de virus de la fiebre del valle del Rift; virus Andes; virus Hantaan; virus Puumala; virus Seoul; virus Sin Nombre; virus Dugbe; virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y virus La Crosse.
- 40 14. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o estado se selecciona de fiebre del valle del Rift; fiebre hemorrágica con síndrome renal; síndrome cardiopulmonar por hantavirus; nefropatía epidémica; fiebre hemorrágica provocada por el virus Seoul; enfermedad del sudor; fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; encefalitis de La Crosse y fiebre por flebotomos.
15. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

FIGURAS 1(A)-(E)

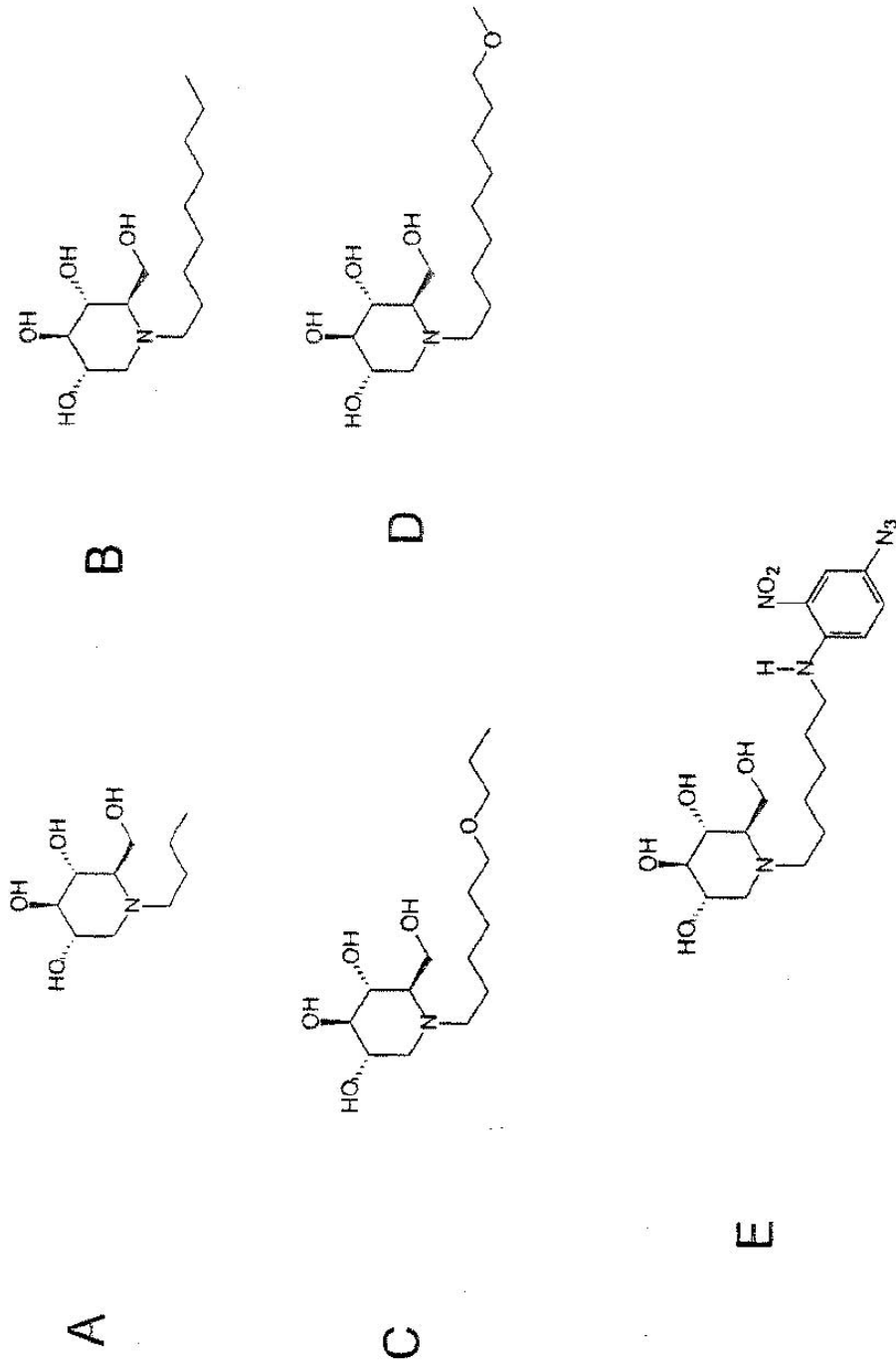


FIGURA 2

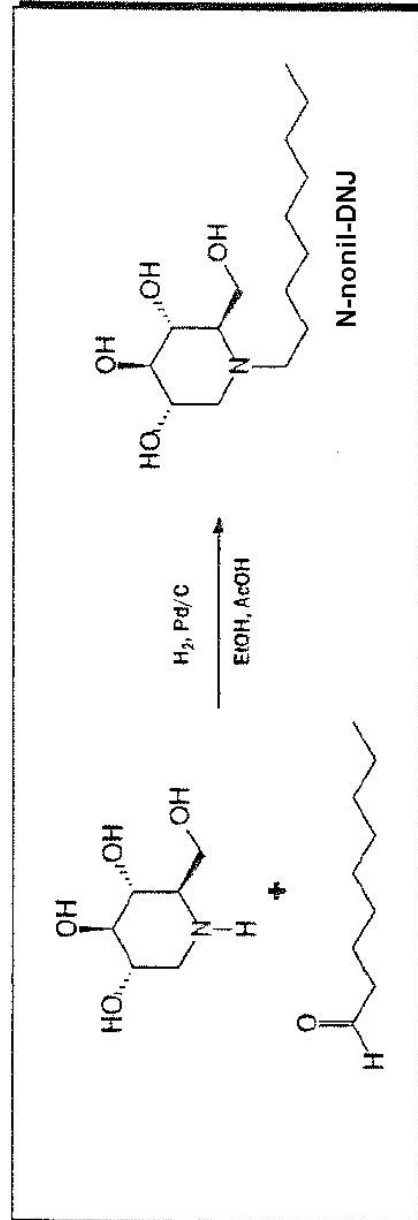
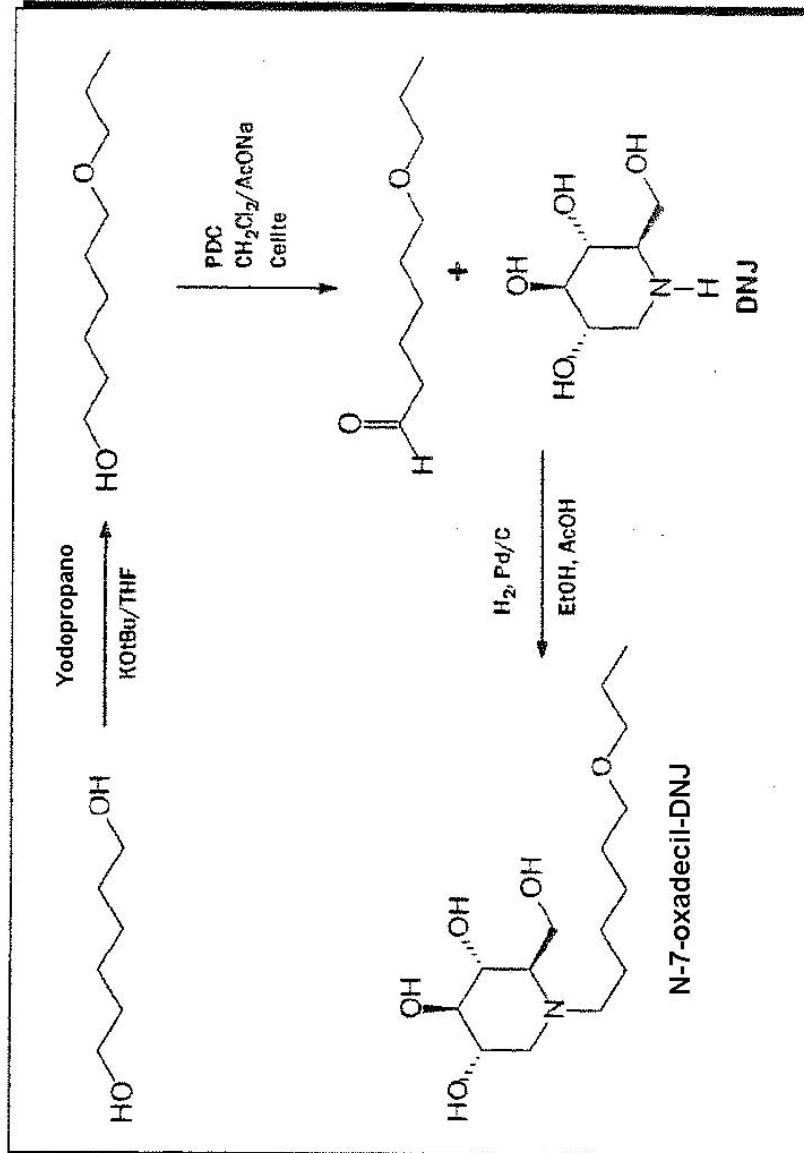
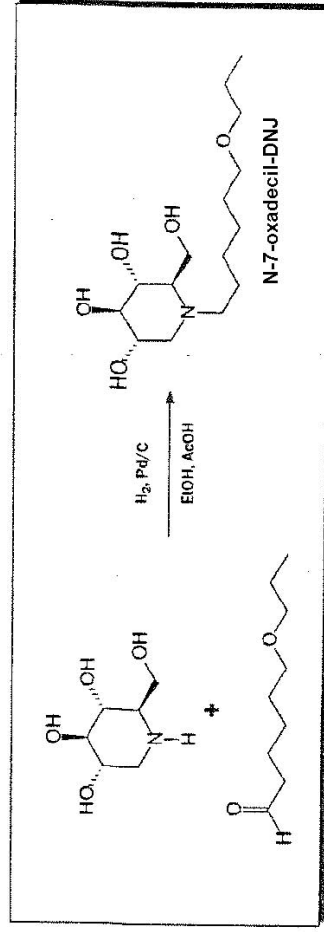
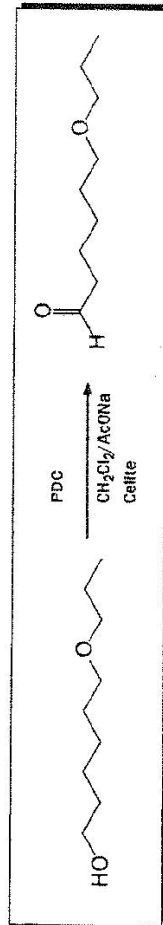
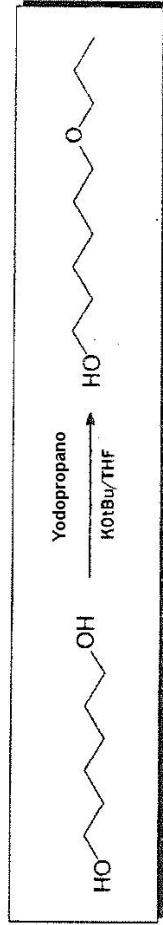


FIGURA 3A



A

FIGURAS 3B-D



FIGURAS 4A-C

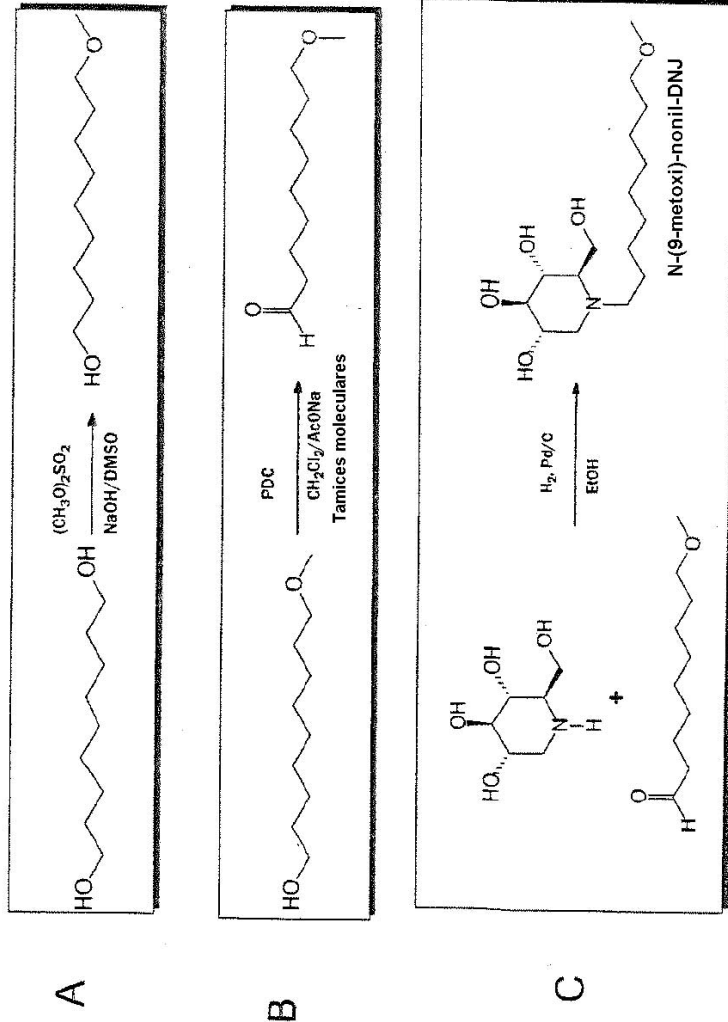


Fig. 5

Compuesto	Actividad frente a familias virales CI50, uM		
	Bunya	Toga	
	RVFV	VEEV	CHIKV
NB-DNJ	250	156	>500
NN-DNJ	58	12	56
N7-0-DNJ	220	>250	500
N9-DNJ	250	>250	500
NAP-DNJ	49	2	22

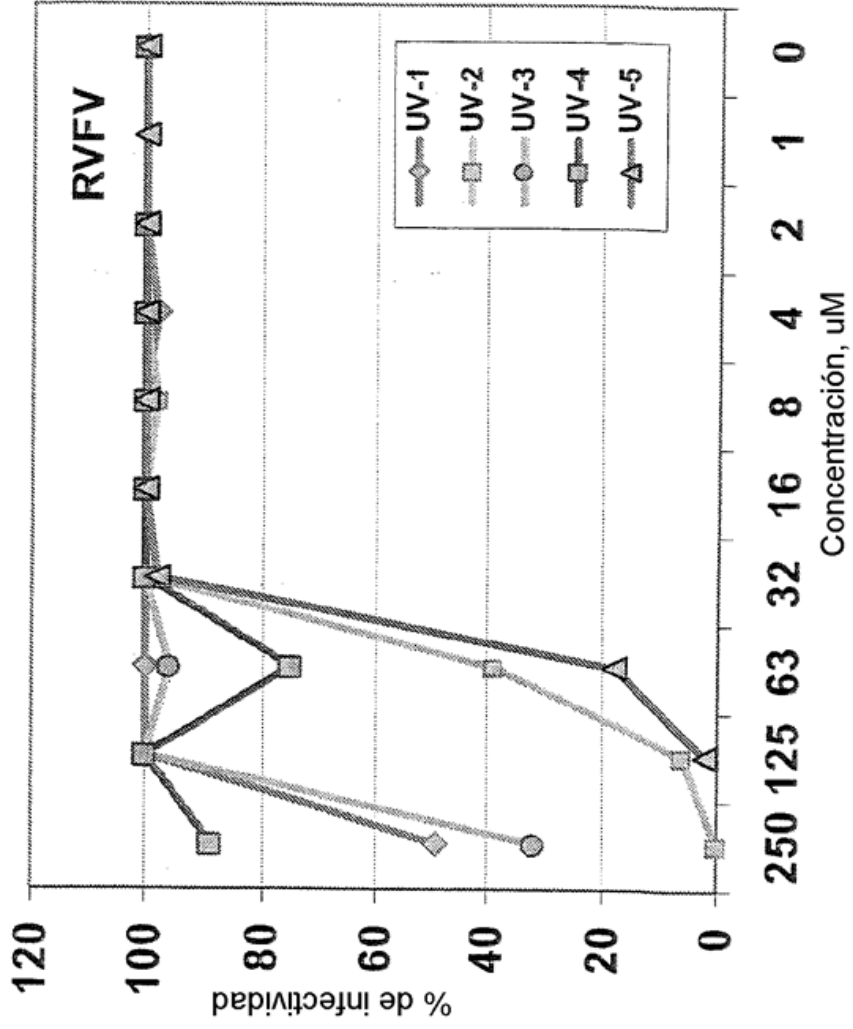
Abreviaturas de virus:

RVFV - Fiebre del valle del Rift

VEEV - Encefalitis equina venezolana

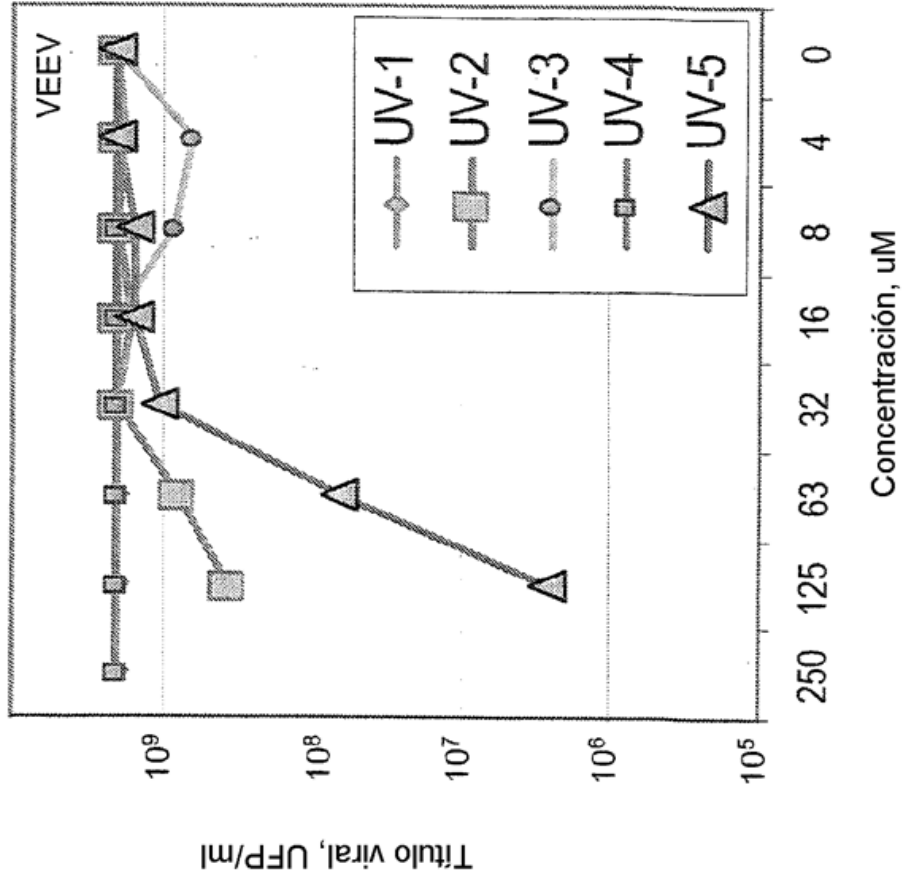
CHIKV - Chikungunya

FIGURA 6



RVFV - Virus de la fiebre del valle del Rift

FIGURA 7



VEEV - Virus de la encefalitis equina venezolana
Fuente: Unither Virology

FIGURA 8

