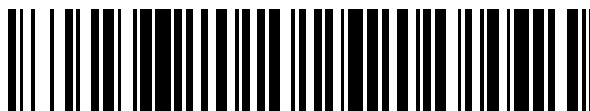


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 012**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/073 (2006.01)

C07H 19/09 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08762936 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2132215**

54 Título: **Compuestos para prevenir o tratar infecciones víricas y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.02.2007 US 891954 P

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

25.11.2015

73 Titular/es:

**THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF
ALBERTA (100.0%)
SUITE 4000, 8308 - 114 STREET
EDMONTON, ALBERTA T6G 2E1, CA**

72 Inventor/es:

**SCHANG, LUIS, M.;
ST. VINCENT, MIREILLE, R. y
USTINOV, ALEXEY, V.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 552 012 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 para prevenir o tratar infecciones víricas y procedimientos de uso de los mismos

5 Antecedentes

Como resultado de la extensa investigación en el descubrimiento de fármacos antivíricos se han autorizado 43 fármacos antivíricos para uso clínico en todo el mundo. Sin embargo, la mayoría de ellos seleccionan como diana a las ADN polimerasas víricas. Dicha predisposición quizá se deba a que la ADN polimerasa de VHS-1 sea la primera diana identificada por primera vez para fármacos antivíricos. La segunda diana descubierta fueron las proteasas víricas, que se requieren para la maduración del virión. Más recientemente, se han centrado esfuerzos significativos en desarrollar fármacos que seleccionan como diana otras proteínas víricas. Un importante énfasis se encuentra en los fármacos que inhiben la infectividad vírica, en los que los fármacos bloquearán los primeros acontecimientos en el proceso de infección vírica. El primer inhibidor de infectividad satisfactorio fue el T-20 o fuzeon, un inhibidor peptídico de los reordenamientos de las proteínas de fusión del VIH. Este fármaco se usa clínicamente, pero solo en tratamientos de combinación. Además, el fármaco ya ha seleccionado la resistencia. Más recientemente, la interacción entre las glucoproteínas del VIH y sus correceptores o receptores celulares también se ha seleccionado como diana (p.ej., vicriviroc-SCH 417690, TAK-779, PRO-140, UK-427,857, GW873140 y AMD887, que todos seleccionan como diana el correceptor CCR5, o AMD3100 y AMD070, que seleccionan como diana el correceptor CXCR4). Sin embargo, todos estos inhibidores de infectividad adolecen de inconvenientes significativos. Por ejemplo, los inhibidores peptídicos tienen una escasa biodisponibilidad y la estabilidad. De esta manera, se deben preparar poco antes de su uso y solo se pueden usar para la administración parenteral. Los inhibidores de la unión al correceptor tienen especificidades limitadas (tales como solamente los virus CCR5 o CXCR4 trópicos). Además, los inhibidores de la unión al receptor también pueden bloquear las actividades de importantes receptores celulares. Por lo tanto, todavía se invierten esfuerzos significativos en el desarrollo de inhibidores novedosos de la fusión vírica que puedan superar tales limitaciones.

Los inhibidores actuales de fusión vírica seleccionan como diana las interacciones entre las proteínas celulares y víricas. De hecho, todos los fármacos antivíricos se han desarrollado tradicionalmente para seleccionar como diana las proteínas víricas, lo que garantiza la especificidad y la seguridad. Este es un concepto demostrado y probado en el tiempo que ha conducido al desarrollo de los 43 fármacos antivíricos en el uso clínico y otros fármacos actualmente en desarrollo. Desafortunadamente, este enfoque tiene varias limitaciones. Los fármacos que seleccionan como diana las proteínas víricas (directa o indirectamente) seleccionan de inmediato la resistencia. Por ejemplo, esto ya ha ocurrido con fuzeon e incluso con los inhibidores de las interacciones CCR5-gp41. El número de dianas víricas potenciales también está limitado por virus con pequeños genomas, tales como el papilomavirus humano. Este enfoque tampoco es propicio para el desarrollo inmediato de fármacos frente a patógenos víricos recién identificados, puesto que las proteínas codificadas por tales patógenos deben ser caracterizadas en primer lugar.

Como alternativa al enfoque tradicional, recientemente se ha investigado la posibilidad de desarrollar fármacos antivíricos que seleccionen como diana las proteínas celulares. Este enfoque proporciona varios beneficios potenciales. La inhibición de proteínas celulares requeridas para múltiples funciones víricas podría minimizar la selección de la resistencia, por ejemplo, y se requiere un número de proteínas celulares para la replicación de los virus con los genomas más pequeños. Además, se requieren muchas proteínas celulares para la replicación de incluso virus lejanamente relacionados. De esta manera, se podrían usar fármacos que seleccionan como diana las proteínas celulares frente a un patógeno novedoso incluso antes de que sus proteínas se caracterizaran totalmente. Sin embargo, la selección como diana de proteínas celulares también podría conducir a efectos colaterales negativos no deseados, puesto que tales dianas se expresan comúnmente en muchas células no infectadas.

50 Sumario

En el presente documento se describen compuestos y procedimientos que previenen la infección vírica de células o tratan un sujeto infectado por un virus. Los compuestos y procedimientos descritos en el presente documento minimizan la resistencia vírica y maximizan el número de virus seleccionados como diana. Adicionalmente, los compuestos y procedimientos minimizan la toxicidad a células no infectadas. Las ventajas de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender por la práctica de los aspectos descritos a continuación. Las ventajas descritas a continuación se pueden lograr y alcanzar por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas. Se ha de entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada solo son ejemplares y explicativas y no son restrictivas.

60 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran varios aspectos descritos a continuación.

65

La figura 1 muestra análisis de transferencias de Southern, que indican que el derivado nucleosídico anfipático dUY1 no inhibe la replicación del ADN de VHS-1.

La figura 2 muestra análisis de transferencias de Southern, que indican que el derivado nucleosídico anfipático dUY1 no inhibe la liberación de ADN de VHS-1 de descendencia.

La figura 3 muestra un ensayo de placa que revela las propiedades inhibidoras de dUY1 en la infectividad vírica.

La figura 4 muestra las tres estructuras tridimensionales y químicas de los derivados nucleosídicos anfipáticos en comparación con los lípidos de membrana representativos.

La figura 5 son gráficos de líneas que muestran la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de los diferentes derivados nucleosídicos anfipáticos.

La figura 6 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de dUY11, donde la CI_{50} es 20 nM.

La figura 7 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente al tiempo de tratamiento.

La figura 8 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de dUY11, donde la inhibición es independiente del tipo de célula.

La figura 9 muestra células infectadas simuladamente tratadas con dUY11 y contrateñidas con un colorante de membrana (PKH26).

La figura 10 es un gráfico de líneas que muestra el número de células relativo representado frente al tiempo de exposición a dUY11, donde dUY11 no tiene efectos citotóxicos o citostáticos importantes.

La figura 11 es un gráfico de barras e imágenes fotográficas que muestran la unión (A) e infectividad (B) de VHS-1, donde dUY11 no inhibe la unión de VHS-1.

La figura 12 es un gráfico de líneas que muestra la competición de VHS-1 que se une a células incrementando la concentración de heparina, donde dUY11 no bloquea la unión de alta afinidad mediante viriones de VHS-1.

La figura 13 muestra imágenes representativas (A) y cuantificación (B) de la expresión de proteínas de fluorescencia roja en células Vero que contienen un gen indicador de la proteína de fluorescencia roja (RFP) recombinado en sus genomas celulares bajo el control del activador de IE ICPO de VHS-1, donde dUY11 inhibe la entrada de VHS-1.

La figura 14 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad la cepa KOS de VHS-1, cepa 186 de VHS-2, cepa 333 de VHS-2, VEV o virus Sindbis representada frente a la concentración de dUY11, donde dUY11 inhibe la infectividad de VHS-1, VHS-2, VEV, y virus Sindbis.

La figura 15 son gráficos de líneas que muestran la infectividad de KOS de VHS-1 representada frente a las concentraciones de dUY11 usadas para tratar previamente viriones o células, o para tratar células solo después de la infección, donde dUY11 solo inhibe totalmente la infectividad de VHS-1 si se usa para tratar previamente viriones.

La figura 16 es un gráfico de líneas que muestra la reducción en la infectividad de viriones producidos por células tratadas con derivados nucleosídicos anfipáticos durante 24 o solo 1 horas y representada frente a la concentración de fármaco, donde dUY11 inhibe la infectividad de viriones descendientes.

La figura 17 son gráficos de líneas que muestran la reducción en la infectividad vírica (o valores víricos) de viriones producidos por células tratadas con diferentes fármacos y representada frente a la concentración de ACV, PAA o dUY11, donde dUY11 inhibe la infectividad de viriones mutantes resistente a fármacos.

La figura 18 son gráficos que muestran la capacidad de dUY11 para proteger ratones *in vivo* frente a la infección vaginal con VHS-2, donde los viriones expuestos a dUY11 no son infecciosos para ratones.

La figura 19 son fotografías de la región vaginal, región perineal y ano de ratones infectados con VHS-2 expuestos a dUY11, donde los viriones expuestos a dUY11 no son infecciosos para ratones.

Descripción detallada

Antes de que se divulguen y describan los presentes compuestos, composiciones, y/o procedimientos, se ha de entender que los aspectos descritos a continuación no se limitan a compuestos, procedimientos sintéticos, o usos específicos puesto que, por supuesto, como tales pueden variar. Se ha de entender que la terminología usada en el presente documento solamente es para el propósito de describir aspectos particulares y no está destinada a ser limitante.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán por tener los siguientes significados:

Cabe destacar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos, y similares.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o circunstancia descritos posteriormente puede tener lugar o no, y que la descripción incluye casos en los que el acontecimiento o circunstancia tiene lugar y casos en los que no. Por ejemplo, la expresión "alquilo inferior opcionalmente sustituido" significa que el grupo alquilo inferior puede estar sustituido o no y que la descripción incluye tanto alquilo inferior no sustituido como alquilo inferior en el que está la sustitución.

Las referencias a las partes en peso en la memoria descriptiva y las reivindicaciones finales, de un elemento o componente particular en una composición o artículo denotan la relación en peso entre el elemento o componente y cualquier otro elemento o componente en la composición o artículo para el que se expresa una parte en peso. De esta manera, en un compuesto que contiene 2 partes en peso de componente X y 5 partes en peso de componente Y, X e Y están presentes en una proporción en peso de 2:5, y están presentes en tal proporción independientemente de si los componentes adicionales están contenidos en el compuesto.

Un porcentaje en peso de un componente, a menos que se establezca específicamente lo contrario, está basado en el peso total de la formulación o composición en la que está incluido el componente.

Por "sujeto" se quiere decir un individuo. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un primate o un ser humano. El término "sujeto" puede incluir animales domésticos incluyendo, pero sin estar limitados a, gatos, perros, etc., ganado (p.ej., ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), y animales de laboratorio (p.ej., ratón, conejo, rata, cobaya, etc.).

Por "poner en contacto" se quiere decir un caso de exposición por contacto físico próximo de al menos una sustancia con otra sustancia. Por ejemplo, poner en contacto puede incluir poner en contacto una sustancia, tal como un agente farmacológico, con una célula o un virus.

"Tratamiento" o "tratar" quiere decir administrar una composición a un sujeto o un sistema con una afección no deseada (p.ej., infección vírica), para reducir los síntomas de la afección no deseada. "Prevenir" o "prevención" quiere decir eliminar la posibilidad de contraer la afección no deseada. "Prevenir" o "prevención" también incluye disminuir la posibilidad de contraer la afección no deseada.

Por "cantidad eficaz" se quiere decir una cantidad terapéutica o preventiva (profiláctica) necesaria para conseguir el resultado o resultados deseado/s.

Un residuo de una especie química, como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones finales, se refiere al resto que es el producto resultante de la especie química en un esquema de reacción particular o producto químico o formulación posterior, independientemente de si el resto se obtiene en realidad a partir de la especie química. Por ejemplo, un sacárido que contiene al menos un grupo -OH se puede representar por la fórmula Z-OH, en la que Z es el remanente (es decir, el residuo) de la molécula de sacárido.

El término "grupo alquilo" como se usa en el presente documento es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo alquilo que contiene de uno a seis átomos de carbono.

El término "grupo arilo" como se usa en el presente documento es cualquier grupo aromático basado en carbono que incluye, pero sin estar limitado a, benceno, naftaleno, etc. El término "aromático" también incluye "grupo heteroarilo", que se define como un grupo aromático que al menos tiene un heteroátomo incorporado en el anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero sin estar limitados a, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más grupos

incluyendo, pero sin estar limitados a, alquilo, alquinilo, alquenilo, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico o alcoxi. El término "grupo arilo" también incluye dos o más grupos aromáticos condensados entre sí. Por ejemplo, el grupo arilo condensado puede estar compuesto de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 anillos de arilo. El grupo arilo condensado puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos descritos anteriormente.

El término "grupo poliéter" como se usa en el presente documento es un grupo que tiene la fórmula $-(\text{CHR})_n\text{O}_m-$, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de desde 1 a 20, y m es un número entero de desde 1 a 100. Los ejemplos de grupos poliéter incluyen poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y poli(óxido de butileno).

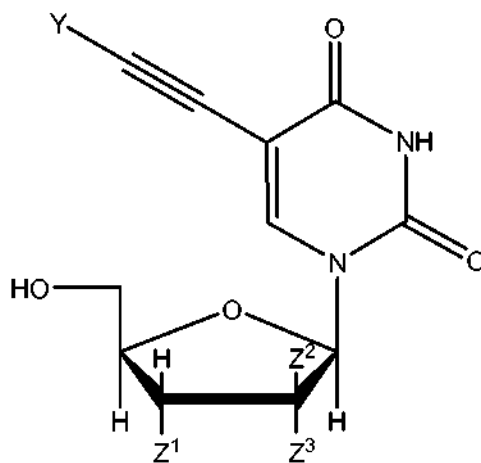
El término "grupo politioéter" como se usa en el presente documento es un grupo que tiene la fórmula $-(\text{CHR})_n\text{S}_m-$, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de desde 1 a 20, y m es un número entero de desde 1 a 100.

El término "grupo poliimino" como se usa en el presente documento es un grupo que tiene la fórmula $-(\text{CHR})_n\text{NR}_m-$, donde cada R es, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de desde 1 a 20, y m es un número entero de desde 1 a 100.

Las variables tales como X, L, L', R, Y, Z¹, Z² y Z³ usadas en toda la solicitud son las mismas variables definidas previamente a menos que se establezca lo contrario.

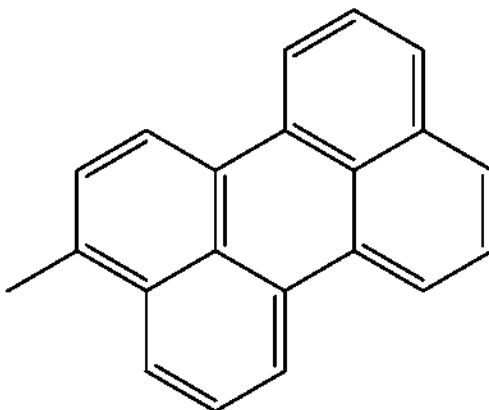
I. Compuestos y preparación de los mismos

En el presente documento se describen compuestos que previenen o reducen la probabilidad de que un virus infecte una célula. En un aspecto, el compuesto comprende la fórmula IIIA



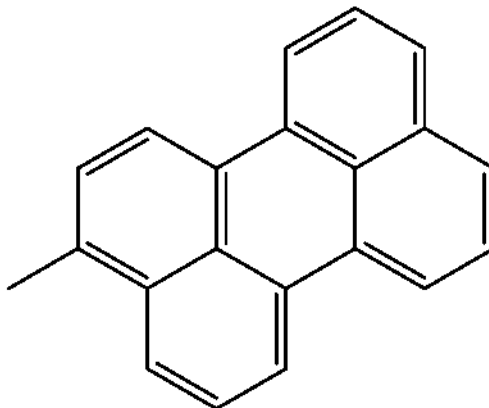
IIIA

en la que Z¹, Z² y Z³ son hidrógeno, e Y es un grupo arilo que tiene la fórmula



en la que el grupo arilo está sustituido o no sustituido. En el presente documento este compuesto se denomina ddUY11. En otro aspecto adicional, el compuesto tiene la fórmula IIIA, en la que Z^1 y Z^2 son OH, Z^3 es hidrógeno, e Y es un grupo arilo que tiene la fórmula

5



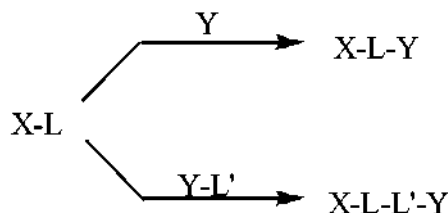
en la que el grupo arilo está sustituido o no sustituido. En el presente documento este compuesto se denomina aUY11.

- 10 Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede existir o convertirse en la sal del mismo. En un aspecto, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales se pueden preparar tratando un ácido libre con una cantidad apropiada de una base química o farmacéuticamente aceptable. Las bases química o farmacéuticamente aceptables representativas son hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido ferroso, hidróxido de cinc, hidróxido de cobre, hidróxido de aluminio, hidróxido férrico, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, lisina, arginina, histidina, y similares. En un aspecto, la reacción se lleva a cabo en agua, solo o en combinación con un disolvente inerte orgánico miscible en agua, a una temperatura de desde aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C tal como a temperatura ambiente. La proporción molar del compuesto con respecto a la base se elige para proporcionar la proporción deseada para cualquier sal particular. Por ejemplo, para preparar las sales de amonio del material de partida de ácido libre, el material de partida se puede tratar con aproximadamente un equivalente de base para dar una sal.

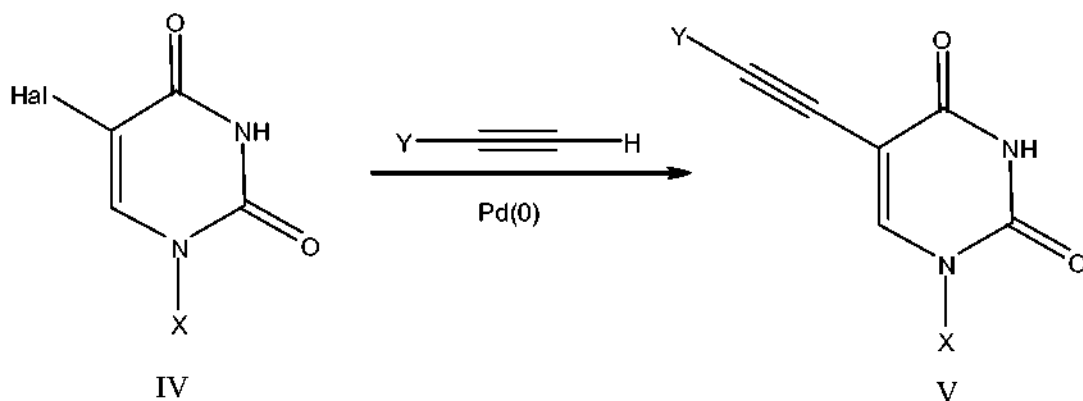
- En otro aspecto, cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede existir o convertirse en la sal con una base de Lewis del mismo. Los compuestos se pueden tratar con una cantidad apropiada de base de Lewis. Las bases de Lewis representativas son hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido ferroso, hidróxido de cinc, hidróxido de cobre, hidróxido de aluminio, hidróxido férrico, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, lisina, arginina, histidina, tetrahidrofurano, éter, reactivo de tiol, alcoholes, tiol éteres, carboxilatos, fenolatos, alcóxidos, agua, y similares. En un aspecto, la reacción se lleva a cabo en agua, solo o en combinación con un disolvente orgánico inerte miscible en agua, a una temperatura de desde aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C tal como a temperatura ambiente. La proporción molar del compuesto con respecto a la base se elige para proporcionar la proporción deseada para cualquier complejo particular. Por ejemplo, las sales de amonio del material de partida de ácido libre, el material de partida se puede tratar con aproximadamente un equivalente de base de Lewis química o farmacéuticamente aceptable para dar un complejo.

- Si los compuestos poseen grupos ácido carboxílico, estos grupos se pueden convertir en ésteres o amidas farmacéuticamente aceptables usando técnicas conocidas en la técnica. De forma alternativa, si un éster está presente, el éster se puede convertir en un éster farmacéuticamente aceptable usando técnicas de transesterificación.

- Los compuestos descritos en el presente documento se pueden sintetizar usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, cuando X-L es un nucleósido, se puede acoplar con Y o Y-L' para producir el compuesto que tiene la fórmula I.



En un aspecto, cuando X-L es un nucleósido representado en la fórmula IV, se puede usar una reacción de acoplamiento para producir el compuesto V.



En este aspecto, X es el sacárido y Hal es un halógeno, tal como yoduro. Un catalizador de paladio se usa para acoplar el alquino $Y-C\equiv CH$ con el compuesto IV para producir compuestos que tienen la fórmula V.

II. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, cualquiera de los compuestos descritos anteriormente se puede formular en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se puede preparar usando técnicas conocidas en la técnica. En un aspecto, la composición se prepara mezclando un compuesto descrito en el presente documento con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se apreciará que las cantidades preferentes reales del compuesto activo que tiene la fórmula I en un caso específico variarán de acuerdo con el compuesto específico que se utiliza, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación y las localizaciones y sujetos que se tratan. Las dosificaciones para un huésped dado se pueden determinar usando consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante la comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos objeto y de un agente conocido, por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado. Los médicos y formuladores, expertos en la técnica de determinar las dosis de compuestos farmacéuticos, no tendrán problemas determinando la dosis de acuerdo con las recomendaciones estándar (Physicians Desk Reference, Barnhart Publishing -1999).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden formular en cualquier excipiente que pueda tolerar el sistema o entidad biológicos. Los ejemplos de tales excipientes incluyen, pero sin estar limitados a, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones acuosas de sales fisiológicamente equilibradas. También se pueden usar vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de sésamo, triglicéridos, propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosol, cresoles, formalina y alcohol bencílico.

Los vehículos farmacéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Lo más típicamente estos serían vehículos estándar para la administración a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina, y soluciones tamponadas a pH fisiológico.

Las moléculas destinadas a administración farmacéutica se pueden formular en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula de elección.

La composición farmacéutica se puede administrar en una serie de maneras dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico, y del área que se va a tratar. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intranasal, vaporización). Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, pulverulentas u oleosas, espesantes y similares.

Las preparaciones para la administración incluyen emulsiones, suspensiones y soluciones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios tamponados y salinos. Los vehículos parenterales, si es necesario para uso colateral de las composiciones y procedimientos divulgados, incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos, si es necesario para uso colateral de las composiciones y procedimientos divulgados, incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir otros fármacos y agentes biológicamente activos. El agente biológicamente activo puede proporcionar un efecto terapéutico, fisiológico o biológico local o sistémico en el sistema biológico. Por ejemplo, el agente puede actuar para controlar la infección o inflamación, potenciar el crecimiento celular y la regeneración tisular, controlar el crecimiento tumoral, actuar como analgésico y potenciar el crecimiento óseo, entre otras funciones. De esta manera, se contemplan tratamientos de combinación si las composiciones descritas en el presente documento pueden reducir o prevenir la infección vírica en combinación con otros beneficios terapéuticos.

III. Procedimientos de uso

Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se pueden usar en una variedad de aplicaciones relacionadas con la prevención o tratamiento de la infección vírica. Un compuesto que comprende la fórmula IIIA como se define anteriormente para su uso para prevenir que un virus infecte células incluye poner en contacto el virus con dicho compuesto.

Los virus se clasifican como con envoltura o sin envoltura, de acuerdo con si sus cápsides están rodeadas o no por una membrana bicapa lipídica derivada de célula huésped (la envoltura). Aunque la envoltura vírica deriva de membranas celulares, las dos bicapas lipídicas presentan diferencias intrínsecas importantes. Funcionalmente, las membranas celulares son barreras físicas selectivas requeridas para separar los entornos intra y extracelulares, mientras que permiten el paso selectivo de determinadas moléculas. Por el contrario, las funciones importantes de la envoltura vírica son fusionarse con las membranas celulares y ocultar del huésped la mayoría de las proteínas víricas del sistema inmunitario. Aunque la envoltura vírica puede conferir alguna protección física en circunstancias limitadas, los virus con envoltura muy a menudo son menos resistentes a los daños físicos o químicos que aquellos sin envoltura. Estructuralmente, tanto la composición lipídica como proteínica de las membranas celulares y la envoltura del virión son diferentes, como lo son sus curvaturas y fluideces.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden denominar como anfipáticos, si un resto de la molécula es hidrófilo (X-L) y otro resto es hidrófobo (Y). Sin pretender vincularse a la teoría, se cree que los compuestos descritos en el presente documento previenen la fusión del virus con envoltura a la membrana celular, que, en definitiva, previene la entrada del virus en la célula. El resto hidrófobo de los compuestos descritos en el presente documento (es decir, Y), se puede insertar por sí mismo en el núcleo hidrófobo de la envoltura lipídica. El resto hidrófilo (es decir, X) interacciona con las cabezas polares en la superficie de la envoltura. De esta manera, los compuestos son miméticos de los fosfolípidos. Sin embargo, los compuestos antivíricos descritos en el presente documento poseen conformaciones que son más notablemente cónicas invertidas que las conformaciones de los lípidos naturales en los estratos externos de las envolturas del virión. Los lípidos de cono invertido en el estrato externo de la envoltura inhiben las transiciones de curvatura requeridas para la fusión entre membranas. Los compuestos anfipáticos, por lo tanto, pueden inhibir la fusión entre la envoltura vírica y la membrana plasmática de la célula. El resto hidrófobo de fórmula IIIA (Y), el resto hidrófilo y la conformación molecular general de los compuestos se puede optimizar fácilmente para interaccionar preferencialmente con la envoltura vírica sobre la membrana celular. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden estar diseñados para prevenir cualquier incorporación potencial en el ADN replicante. Los ejemplos de tales modificaciones se pueden observar en los compuestos ddUY11 y aUY11 (véanse ejemplos). En el caso de ddUY11, se ha eliminado un hidroxilo en el resto de azúcar de dUY11 para producir ddUY11. Con aUY11, el azúcar desoxirribosa de dUY11 se reemplazó por un azúcar arábino.

Los virus que se pueden seleccionar como diana no son específicos. Los virus que se pueden seleccionar como diana incluyen virus con envoltura tales como, por ejemplo, poxvirus, virus del herpes simple tipos 1 o 2 (VHS-1, VHS-2), virus de la gripe, VIH, virus de la leucemia de células T humanas (VLTH), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus humano (CMVH), virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (HVS-K), virus varicela-zóster (VVZ), virus de la hepatitis B, virus de hepatitis C, poxvirus, virus del Ébola, virus de Marburgo, virus paragripal, virus respiratorio sincitial humano, virus Hendra, virus Nipah, virus de la parotiditis, virus del sarampión, hantavirus, bunyavirus, virus de la fiebre del Valle del Rift, arenavirus, incluyendo virus sin nombre, virus de la rabia, virus de la encefalitis oriental, occidental y venezolana, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa y de San Luis, coronavirus (p.ej., virus SRAG) o virus de la rubéola.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para prevenir o reducir la infección vírica. En un aspecto, en el presente documento se describe un compuesto como se define anteriormente para su uso para prevenir que un virus infecte a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de dicho compuesto. El compuesto se puede administrar usando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. En un aspecto, el compuesto se aplica a un foco infeccioso. El término "foco infeccioso" es una o más partes del cuerpo del sujeto que al entrar en contacto con un virus el sujeto se infecta. Los ejemplos de tales focos infecciosos incluyen los revestimientos de la mucosa (p.ej., los conductos vaginal, rectal, nasal). De esta manera, en un aspecto, los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar como profilácticos en la prevención de enfermedades de transmisión sexual. En este aspecto, el compuesto se formula como una formulación tópica (p.ej., gel, loción o crema) que se puede aplicar directa o indirectamente en la vagina o recto. En otro aspecto, los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar como profilácticos en la prevención de enfermedades respiratorias. En este aspecto, el compuesto se puede formular como una pulverización que se puede aplicar en las vías respiratorias.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar como productos terapéuticos para tratar a un sujeto infectado con un virus. En un aspecto, el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto definido anteriormente en el presente documento a un sujeto que necesita tal tratamiento. Los compuestos descritos en el presente documento pueden reducir las propiedades infecciosas del virus, que, en definitiva, pueden reducir la propagación del virus así como los síntomas de la enfermedad producidos por el virus. Cuando se usa como producto terapéutico, los compuestos se pueden administrar en una serie de maneras, incluyendo por vía oral, por vía parenteral o por vía tópica.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para prevenir que un virus en el entorno infecte a un sujeto. El procedimiento implica descontaminar el entorno con uno o más compuestos que comprenden la fórmula IIIA. El entorno implica cualquier ambiente o sustrato (p.ej., un dispositivo médico) que ha entrado en contacto con el virus. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento se pueden pulverizar sobre un sustrato expuesto a uno o más virus en el que el compuesto entra en contacto con el virus. Como otro ejemplo, el compuesto puede estar en una solución, donde el sustrato se sumerge en la solución o la solución se coloca en el sustrato (p.ej., tubos u otros espacios restringidos) para inactivar cualquier virión potencial presente en el sustrato.

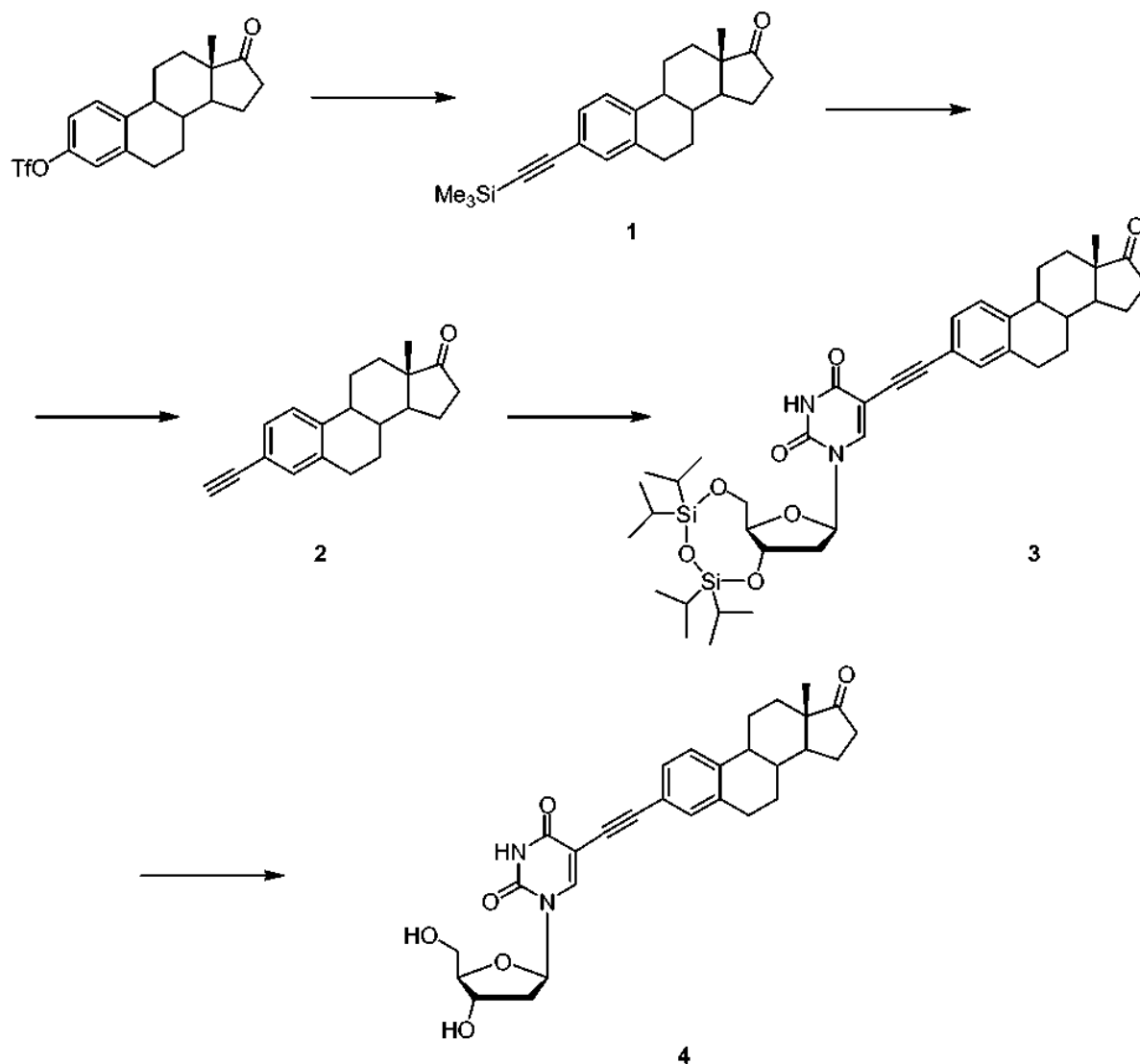
En otro aspecto, los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para inactivar un virus para producir una vacuna. El procedimiento implica poner en contacto el virus con uno o más compuestos que comprenden la fórmula IIIA como se define anteriormente. A continuación, el virus inactivado se puede administrar como una vacuna usando técnicas conocidas en la técnica.

Ejemplos

Se exponen los siguientes ejemplos a fin de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan los compuestos, composiciones y procedimientos descritos y reivindicados en el presente documento, y están destinados a ser meramente ejemplares y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran ser su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se han de explicar algunos errores y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o está a temperatura ambiente, y la presión es la atmosférica o cercana a ella. Hay numerosas variaciones y combinaciones de las condiciones de reacción, p.ej., concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones y otros intervalos y condiciones de reacción que se pueden usar para optimizar la pureza del producto y el rendimiento obtenido a partir del procedimiento descrito. Solo se requerirá la experimentación rutinaria y razonable para optimizar tales condiciones de procedimiento.

I. Preparación de compuestos que tienen la fórmula I

a. Procedimiento 1



3-(trimetilsililetilnil)estrone (1). Se desgasificó una solución de 3-O-trifluorometilsulfonilestrona (972 mg, 2,41 mmol) en DMF (10 ml) tres veces alternando entre vacío y argón. Se añadieron trimetilsililacetileno (0,68 ml, 4,82 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (279 mg, 0,24 mmol), yoduro de cobre (I) (93 mg, 0,48 mmol) y trietilamina (0,67 ml, 4,82 mmol) y la mezcla se agitó durante 48 h. Después de que la mezcla se vertió en agua (100 ml) y EtOAc (200 ml), se lavó la capa orgánica con agua (43100 ml), Na₂EDTA acuoso 0,1 M (23100 ml) y agua (2300 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc al 1 % a 4 % en PhMe) para dar el producto del título como un sólido incoloro. Rendimiento 790 mg (94 %). RMN de ¹H (CDCl₃): 0,26 (s, 9H), 0,94 (s, 3H), 1,40-1,71 (m, 6H), 1,96-2,58 (m, 7H), 2,86-2,95 (m, 2H), 7,21-7,30 (m, 3H).

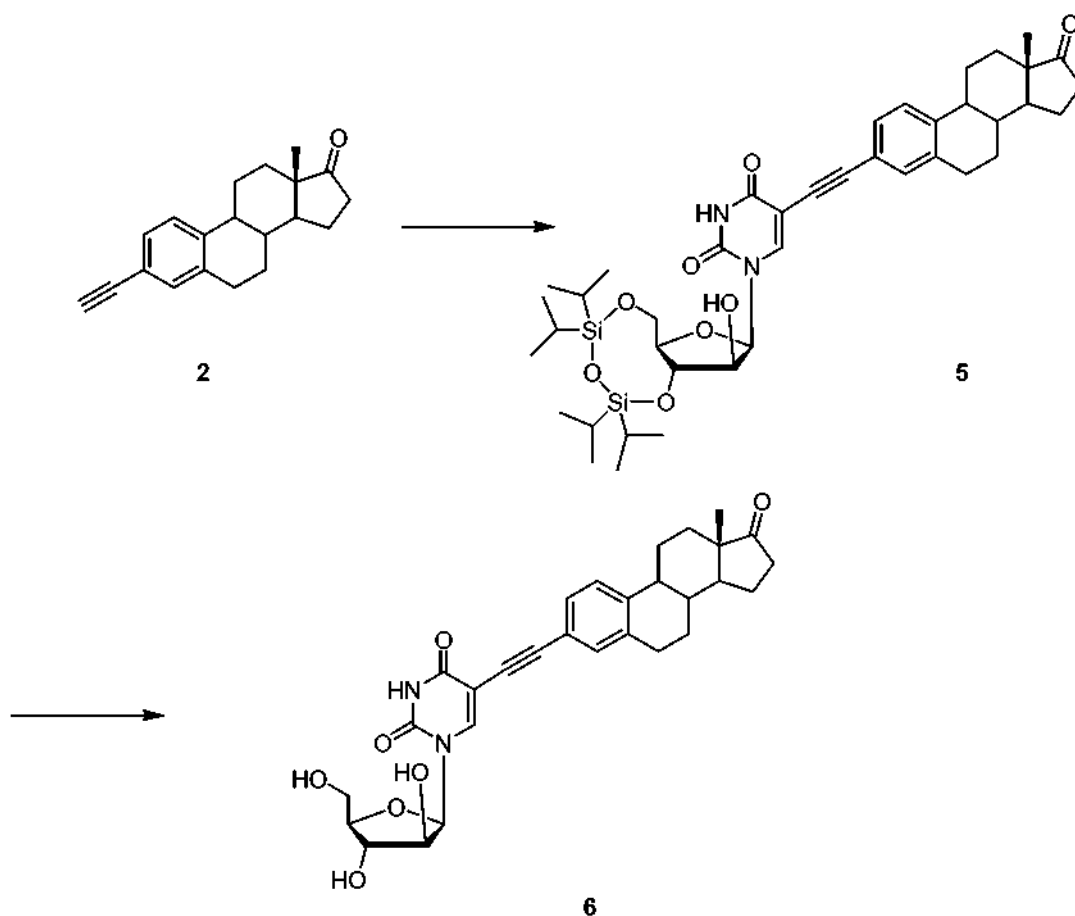
3-etinilestrona (2). Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio trihidratado (1,23 g, 3,9 mmol) a una solución agitada de 3-(trimetilsililetilnil)estrone (697 mg, 1,95 mmol) en argón. Se agitó la mezcla a TA durante 4 h y se evaporó. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc al 5 % a 7 % en PhMe), para dar el producto del título como un sólido blanquecino. Rendimiento 530 mg (98 %). RMN de ¹H (CDCl₃): 0,94 (s, 3H), 1,41-1,72 (m, 6H), 1,95-2,59 (m, 7H), 2,88-2,96 (m, 2H), 3,04 (s, 1H), 7,24-7,33 (m, 3H).

3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-(estrone-3-iletinil)-2'-desoxiuridina (3). Se desgasificó una solución de 3-etinilestrona (61 mg, 0,215 mmol) y 3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-yodo-2'-desoxiuridina (117 mg, 0,196 mmol) en DMF (10 ml) tres veces alternando entre vacío y argón. Se añadieron (trifenilfosfina)paladio (23 mg, 0,02 mmol), yoduro de cobre (I) (4 mg, 0,04 mmol) y trietilamina (0,10 ml, 0,39 mmol) se le añadieron y la mezcla se agitó durante 48 h. Después de que la mezcla se vertió en agua (100 ml) y EtOAc (200 ml), se lavó la capa orgánica con agua (4300 ml), Na₂EDTA acuoso 0,1 M (23100 ml) y agua (23100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc al 10 % en PhMe) para dar el

producto del título como un sólido amarillento. Rendimiento 79 mg (54%). RMN de ^1H (CDCl_3): 0,85 (s, 3H), 0,92-1,18 (m, 28H), 1,33-1,62 (m, 6H), 1,73-1,81 (m, 1H), 1,93-2,52 (m, 8H), 2,84-2,97 (m, 2H), 3,55-3,84 (m, 1H), 4,23-4,29 (s, 2H), 6,14 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz), 7,20 (s, 1H), 7,32 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,42 (d, 1H, $J = 8,25$), 8,33 (s, 1H).

- 5 5-(estrona-3-iletinil)-2'-desoxiuridina (4). Se disolvió 3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-(estrona-3-iletinil)-2'-desoxiuridina (70 mg, 0,093 mmol) en THF (1 ml) y se trató con trifluorhidrato de trietilamina (46 ml, 0,28 mmol). Se mantuvo la mezcla a TA durante 24 h y el precipitado formado se separó por centrifugación. Se recristalizó el sólido a partir de THF-MeOH para dar el compuesto del título como un sólido incoloro. Rendimiento 44 mg (94 %). RMN de ^1H (CDCl_3): 0,85 (s, 3H), 1,35-1,64 (m, 6H), 1,75-1,84 (m, 1H), 1,93-2,49 (m, 8H), 2,81-2,97 (m, 2H), 3,56-3,85 (m, 3H), 4,23-4,29 (s, 2H), 6,14 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz), 7,20 (s, 1H), 7,32 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,42 (d, 1H, $J = 8,25$), 8,34 (s, 1H).

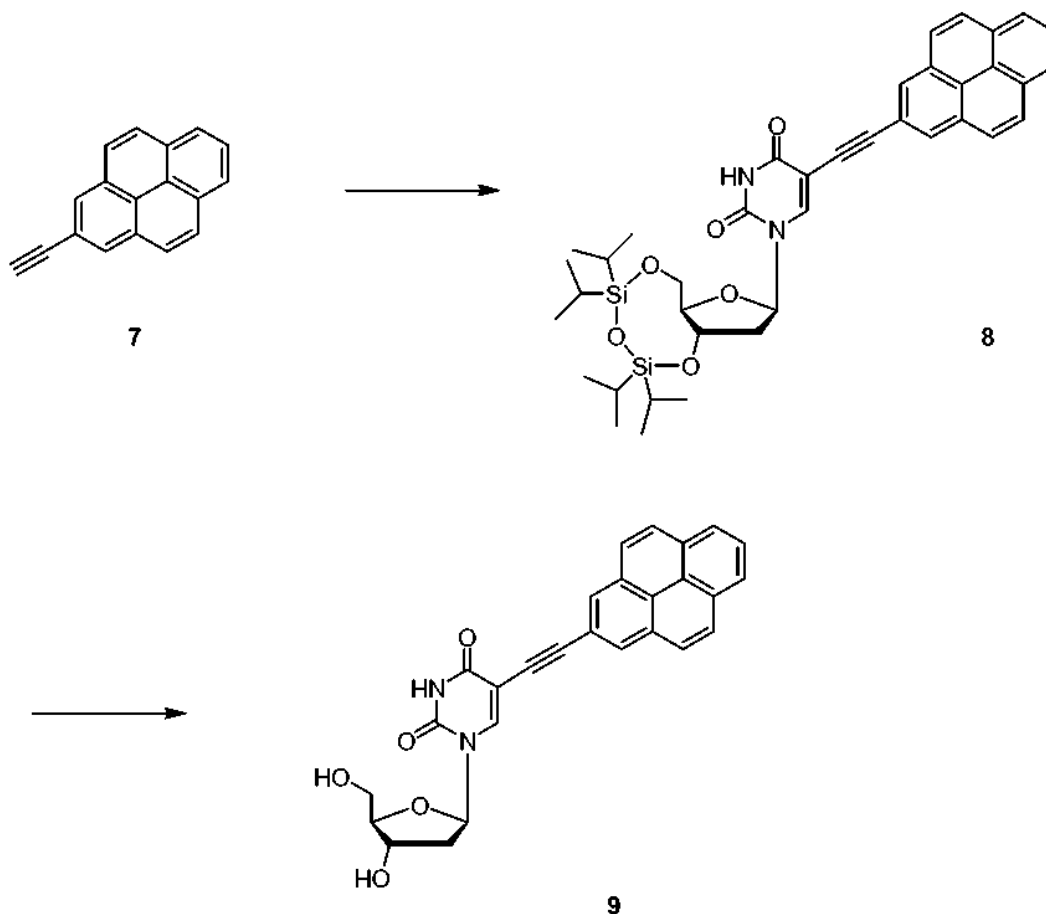
b. Procedimiento 2



- 15 3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-(estrona-3-iletinil)-*arabino*-uridina (5). Se desgasificó una solución de 3-etinilestrona (100 mg, 0,36 mmol) y 3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-yodo-*arabino*-uridina (197 mg, 0,32 mmol) en DMF (7 ml) tres veces alternando entre vacío y argón. Se añadieron (trifenilfosfina)paladio (38 mg, 0,032 mmol), yoduro de cobre (I) (7 mg, 0,064 mmol) y trietilamina (0,17 ml, 0,64 mmol) y la mezcla se agitó durante 48 h. Después de que la mezcla se vertió en agua (100 ml) y EtOAc (200 ml), se lavó la capa orgánica con agua (43100 ml), Na_2EDTA acuoso 0,1 M (2300 ml) y agua (2300 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, Me_2CO al 20 % en PhMe) para dar el producto del título como un sólido amarillento. Rendimiento 70 mg (29 %). RMN de ^1H (CDCl_3): 0,85 (s, 3H), 0,92-1,17 (m, 28H), 1,35-1,64 (m, 6H), 1,74-1,82 (m, 1H), 1,92-2,49 (m, 6H), 2,81-2,89 (m, 2H), 3,66-3,89 (m, 1H), 3,88-4,16 (m, 5H), 6,08 (d, 1H, $J = 6,41$ Hz), 7,17 (s, 1H), 7,20 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,33 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,66 (s, 1H), 11,7 (s. a.).

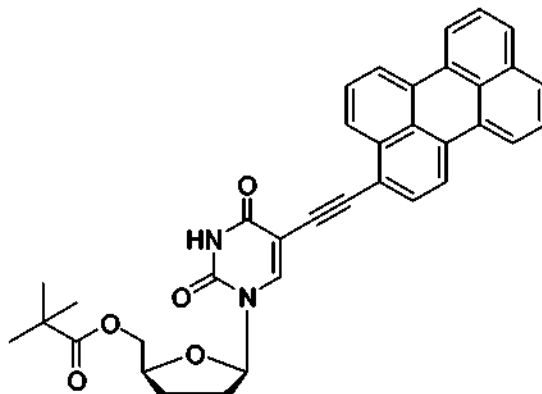
- 5-(estrona-3-iletinil)-*arabino*-desoxiuridina (6). Se disolvió 3',5'-O-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil-5-(estrona-3-iletinil)-*arabino*-uridina (70 mg, 0,091 mmol) en THF (1 ml) y se trató con trifluorhidrato de trietilamina (44 ml, 0,27 mmol). Se mantuvo la mezcla a TA durante 24 h y el precipitado formado se separó por centrifugación. Sólido incoloro. Rendimiento 41 mg (87 %). RMN de ^1H (CDCl_3): 0,85 (s, 3H), 1,31-1,62 (m, 6H), 1,74-1,83 (m, 1H), 1,90-2,51 (m, 6H), 2,80-2,90 (m, 2H), 3,66-3,89 (m, 2H), 3,91-4,13 (m, 6H), 6,08 (d, 1H, $J = 6,41$ Hz), 7,17 (s, 1H), 7,20 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,33 (d, 1H, $J = 8,25$), 7,62 (s, 1H), 11,5 (s. a.).

c. Procedimiento 3

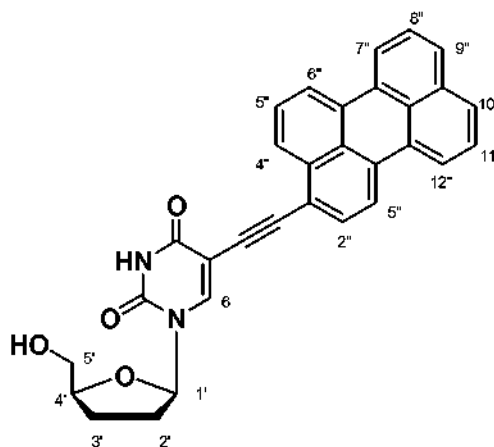


5 3',5'-O-tetraisopropylidene-1,3-di-O-(2-ethynylporene)-2'-deoxyuridine (8). Se desgasificó una solución de
 2-ethynylporene (345 mg, 1,53 mmol) y 3',5'-O-tetraisopropylidene-1,3-di-O-5-yodo-2'-deoxyuridine (758 mg,
 1,27 mmol) en DMF (10 ml) tres veces alternando entre vacío y argón. Se añadieron (trifenilfosfina)paladio (147 mg,
 0,127 mmol), yoduro de cobre (I) (48 mg, 0,25 mmol) y trietilamina (0,35 ml, 2,54 mmol) y la mezcla se agitó durante
 10 24 h. Después de que la mezcla se vertió en agua (100 ml) y EtOAc (200 ml), se lavó la capa orgánica con agua
 (43100 ml), Na₂EDTA acuoso 0,1 M (23100 ml) y agua (23100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se
 evaporó. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc al 0 % a 5 % en CHCl₃) para dar el
 producto del título como un sólido amarillento. Rendimiento 402 mg (49 %). RMN de ¹H (CDCl₃): 0,90-1,17 (m, 28H),
 15 2,19-2,34 (m, 2H), 3,64-3,78 (m, 2H), 3,84-3,92 (m, 1H), 4,30-4,37 (m, 1H), 6,22 (t, 1H, J = 6,42 Hz), 8,09-8,49 (m, 9H),
 8,62 (s, 1H), 11,8 (s. a.).

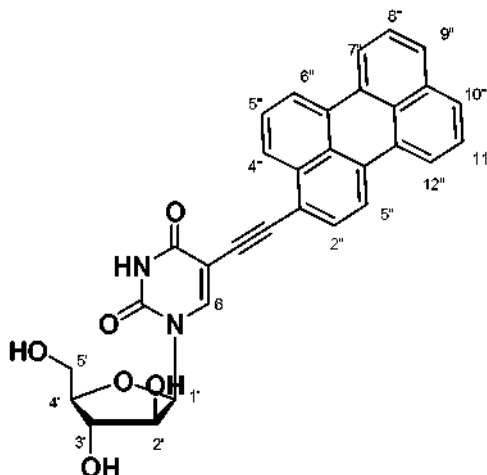
5-(2-ethynylporene)-2'-deoxyuridine (9). Se disolvió
 3',5'-O-tetraisopropylidene-1,3-di-O-5-(2-ethynylporene)-2'-deoxyuridine (200 mg, 0,29 mmol) en THF (1 ml) y se
 trató con trifluorhidrato de trietilamina (0,14 ml, 0,86 mmol). Se mantuvo la mezcla a TA durante 24 h y el precipitado
 20 separó por filtración. Se recristalizó el sólido a partir de EtOH para producir un sólido incoloro. Rendimiento 74 mg
 (56 %). RMN de ¹H (CDCl₃): 2,19-2,34 (m, 2H), 3,64-3,76 (m, 2H), 3,84-3,91 (m, 1H), 4,29-4,34 (m, 1H), 5,23-5,32 (m,
 2H), 6,22 (t, 1H, J = 6,42 Hz), 8,09-8,48 (m, 9H), 8,62 (s, 1H), 11,9 (s. a.).



5-(perilen-3-iletinil)-5'-O-pivaloil-2',3'-didesoxiuridina. Se desgasificó una solución de 5-yodo-5'-O-pivaloil-2',3'-didesoxiuridina (442 mg, 1 mmol) y 3-perilenilacetileno (345 mg, 1,25 mmol) en 10 ml de DMF tres veces con alternancia entre vacío y argón. A continuación, se añadieron $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (115 mg, 0,1 mmol), CuI (38 mg, 0,2 mmol) y Et_3N (0,278 ml, 2 mmol) y se desgasificó el matraz nuevamente, se llenó con argón y la mezcla se agitó durante 43 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 300 ml de EtOAc, se lavó con 33200 ml de agua, se secó con Na_2SO_4 , y se evaporó. La cromatografía en una columna de gel de sílice que usa un gradiente de EtOH/ CHCl_3 al 0 a 2 % dio lugar a un producto cromatográficamente homogéneo (R_f 0,28, EtOH/ CHCl_3 al 5 %) como una espuma naranja (545 mg, 96 %). RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$): 11,85 (s, 1H, NH), 8,44 (d, 1H, J 7,8), 8,39-8,35 (m, 3H), 8,32 (d, 1H, J 8,2) (perilenilo), 8,06 (s, 1H, H-6), 7,83-7,81 (m, 2H), 7,69-7,60 (m, 2H), 7,58-7,53 (m, 2H) (perilenilo), 6,00 (dd, 1H, $J_{1',2'\alpha}$ 6,9 $J_{1',2'\beta}$ 4,6, H-1'), 4,37-4,34 (m, 1H, H-4'), 4,32-4,26 (m, 2H, H-5'), 2,42-2,36 (m, 1H, H-2'), 2,17-2,12 (m, 1H, H-2'), 2,06-2,00 (m, 1H, H-3'), 1,90-1,83 (m, 1H, H-3'), 1,17 (s, 9H, ^tBu).



5-(perilen-3-iletinil)-2',3'-didesoxiuridina (ddUY11). Se añadió a una suspensión de 5-(perilen-3-iletinil)-5'-O-pivaloil-2',3'-didesoxiuridina (350 mg, 0,613 mmol) en 80 ml de MeOH KOH sólido (310 mg, 5,517 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche. A continuación, se neutralizó la mezcla con ácido acético, se evaporó a presión reducida, se coevaporó con MeOH dos veces para dar un producto en bruto, que se purificó cromatográficamente en una columna de gel de sílice usando un gradiente de EtOH/ CHCl_3 al 0 a 3 % para dar un producto cromatográficamente homogéneo (R_f 0,46, acetona/ CHCl_3 al 37,5 %) como un sólido naranja (130 mg, 43 %). RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$): 11,74 (s, 1H, NH), 8,76 (s, 1H, H-6), 8,45 (d, 1H, J 7,7), 8,41-8,38 (m, 2H), 8,36 (d, 1H, J 7,7), 8,30 (d, 1H, J 7,7), 7,71-7,54 (m, 6H) (perilenilo), 5,99-5,98 (m, 1H, H-1'), 5,35 (s. a., 1H, OH), 4,15-4,10 (m, 1H, H-4'), 3,70 (d. ap., 1H, H-5'), 3,63 (d. ap., 1H, H-5'), 2,38-2,31 (m, 1H, H-2'), 2,17-2,13 (m, 1H, H-2'), 2,01-1,94 (m, 1H, H-3'), 1,91-1,86 (m, 1H, H-3').



5-(perilen-3-iletinil)-*arabino*-uridina (aUY11). Se añadió a una solución de 5-(perilen-3-iletinil)-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-*arabino*-uridina (220 mg, 0,289 mmol) en 0,8 ml de THF Et₃N·HF no diluido (0,118 ml, 0,723 mmol), y la mezcla se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una pequeña cantidad de metanol para precipitar el producto, que se filtró y se secó. Sólido naranja (100 mg, 67 %), *R*_f 0,30 (EtOH/CHCl₃ al 10 %). RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): 12,00-11,00 (s. a., 1H, NH), 8,46 (d, 1H, *J* 7,7), 8,43-8,38 (m, 2H), 8,36 (d, 1H, *J* 7,7), 8,30 (d, 1H, *J* 8,33) (perilenilo), 8,26 (s, 1H, H-6), 7,84 (t, 2H, *J* 7,0), 7,73 (d, 1H, *J* 7,7), 7,69 (t, 1H, *J* 7,7), 7,57 (t, 2H, *J* 7,7) (perilenilo), 6,07 (d, 1H, *J* 3,9, H-1'), 5,77-5,68 (s. a., 1H), 5,60-5,48 (s. a., 1H), 5,32-5,20 (s. a., 1H) (OH), 4,12-4,09 (s. ap., 1H), 4,03-3,98 (s. ap., 1H) (H-2', H-4'), 3,82 (d. ap., 1H, H-5'), 3,74-3,67 (m, 2H, H-3',5').

II. Los derivados nucleosídicos anfipáticos no inhiben la replicación del ADN de VHS-1 o la liberación de viriones por células infectadas

Los derivados nucleosídicos o nucleotídicos típicamente inhiben la replicación del ADN de VHS-1 seleccionado como diana la ADN polimerasa vírica. Para identificar si los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben tanto la replicación del ADN vírico como la expresión del gen vírico, se sometió a prueba la capacidad de los derivados nucleosídicos anfipáticos para inhibir la acumulación de ADN de VHS-1. Las células Vero se infectaron simuladamente (M) o se infectaron con 5 unidades formadoras de placas (UFP)/célula de VHS-1 natural durante 1 h, se lavaron y se cubrieron con medio que contenía no fármaco (ND), 400 μM de ácido fosfonoacético (PAA) o 2 μM de un derivado nucleosídico anfipático representativo, dUY11 (11) (figura 4). Se recogieron las células 1,5, 18 o 24 horas después de la infección (hdi), el ADN se aisló, se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se hibridó con el fragmento de VHS-1 BamK de 6 kb. Los análisis de transferencias de Southern (figura 1) muestran los niveles de ADN vírico intracelular 1,5, 18 y 24 hdi. dUY11 no inhibe la replicación del ADN vírico en cualquier momento sometido a prueba.

La capacidad de los derivados nucleosídicos anfipáticos para inhibir la liberación de los viriones de VHS-1 por células infectadas se sometió a prueba posteriormente. Las células Vero se infectaron simuladamente (M) o se infectaron con 5 UFP/célula de VHS-1 natural durante 1 h, se lavaron y se cubrieron con medio que contenía no fármaco (ND), 400 μM de ácido fosfonoacético (PAA) o 2 μM de un derivado nucleosídico anfipático representativo, dUY11 (11). Los sobrenadantes de células infectadas se recogieron 1,5, 18 o 24 hdi, el ADN se aisló, se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se hibridó con el fragmento de VHS-1 BamK de 6 kb. Los análisis de transferencias de Southern (figura 2) muestran los niveles de ADN vírico extracelular 1,5, 18 y 24 hdi. dUY11 no inhibe la liberación de ADN de VHS-1. En base a estos hallazgos, el ADN vírico se replica y los viriones descendientes se liberan de las células infectadas en presencia de estos derivados nucleosídicos anfipáticos.

III. Los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben la infectividad de viriones maduros

Los ensayos de placa e infectividad (figura 3) revelaron las propiedades inhibitoras de dUY11 en la infección vírica. Se incubaron los inóculos de VHS-1 a 37 °C durante 0 o 5 minutos con 2 μM de dUY11 (mitad izquierda de cada panel) o con vehículo de DMSO (mitad derecha de cada panel). Se infectaron células Vero con 0,5; 5; 50; 500; 5.000; o 50.000 UFP de VHS-1 tratado, como se indica en la ilustración (panel superior), se lavaron y se cubrieron con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 5 % y metilcelulosa (MC) 2 %. Las muestras presentadas en el panel más a la derecha se infectaron con viriones no tratados en ausencia de

dUY11 y se cubrieron con MC al 1 % en DMEM-FBS al 5 % complementado con dUY11 2 μ M (después de adsorción). dUY11 inhibe la infectividad vírica pero no tiene efecto sobre la replicación vírica.

IV. Estudios de relación estructura-actividad (SAR) sobre los derivados nucleosídicos anfipáticos antivíricos

Se aplicaron los estudios de relación estructura-actividad (SAR) para someter a prueba los efectos de la anfipaticidad, rigidez, y conformación molecular sobre la infectividad del virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), un buen modelo en el descubrimiento de fármacos antivíricos. La figura 4 muestra las estructuras químicas y vistas ortogonales de las estructuras tridimensionales de los compuestos de prueba. La figura 5 muestra gráficos de líneas de la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de los diferentes derivados nucleosídicos anfipáticos. Se incubaron KOS de VHS-1 (200 UFP) con dUY2 (círculos negros), dUY3 (cuadrados blancos), dUY11 (triángulos negros) (A); dUY4 (triángulos negros), dUY5 (círculos negros), dUY6 (cuadrados blancos), dUY8 (círculos blancos) (B); o dUY7 (círculos blancos), dUY9 (cuadrados negros), dUY1 (triángulos blancos), aUY1 (círculos negros) (C) 0, 2, 7, 20, 70 o 200 μ M durante 5 minutos a 37°C. A continuación, las células Vero se infectaron durante 1 hora con los viriones tratados previamente de este modo, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 %. El valor máximo en la escala del eje x es 70 μ M para (A) y 200 μ M para (B) y (C). La infectividad en porcentaje para viriones tratados previamente con dUY11 (C) está demasiado próxima a los ejes en esta escala y, de esta manera, es claramente visible. Las barras de error representan intervalos de tres o más experimentos. Entre los compuestos de conformación de cono invertido con restos hidrófobos planos rígidos, disminuye en tamaños de restos hidrófobos una actividad disminuida (dUY11 frente a dUY2, dUY3; figura 5A). Las actividades de los compuestos con derivados hidrófobos de tamaño similar se redujeron por flexibilidad rotacional o no planaridad en el resto hidrófobo (dUY11 frente a dUY4, dUY5, dUY6, dUY8; figuras 5 A,B), lo que redujo la conformación de cono invertido. La actividad se alteró por dos grupos polares en los restos hidrófobos del núcleo o enlazador (dUY7, dUY9; figura 5 C), lo que previno el propio posicionamiento del cono invertido en la membrana. La actividad también se inhibió por un grupo polar, pero se rescató incrementando la polaridad del resto hidrófilo (aUY1 frente a dUY1; figura 5 C). La anfipaticidad y conformación de cono invertido, así como la planaridad y rigidez del resto hidrófobo son importantes para la actividad antivírica.

V. Caracterización de las actividades de dUY11 sobre la infectividad de VHS

La figura 6 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de dUY11. Se incubó KOS de VHS-1 (200 UFP) con dUY11 0, 2, 7, 20, 70, 200 o 700 nM durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, las células Vero se infectaron con los viriones tratados previamente de este modo durante 1 hora, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 %. Se calculó gráficamente la concentración de dUY11, que inhibió un 50 % de infectividad de VHS-1 (CI_{50}), que fue 20 nM. Las barras de error representan intervalos de diez experimentos. dUY11 fue activo en el intervalo nanomolar bajo a medio, que presenta una CI_{50} de 20 nM.

La figura 7 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente al tiempo de tratamiento. Se incubó KOS de VHS-1 (200 UFP) con dUY11 20 nM (CI_{50}) a 37 °C durante 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 o 300 segundos. A continuación, las células Vero se infectaron con los viriones tratados previamente de este modo durante 1 hora, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 %. dUY11 CI_{50} inhibe la infectividad de VHS-1 en un 50 % en 220 segundos (figura 7). Las barras de error representan el intervalo de dos experimentos, pero no son visibles en esta escala para la mayoría de los puntos de datos.

La figura 8 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de VHS-1 representada frente a la concentración de dUY11. Se incubó KOS de VHS-1 (200 UFP) con dUY11 0, 2, 7, 20, 70, 200 o 700 nM durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, los fibroblastos de prepucio humano (HFF) (●) o células Vero (■) se infectaron durante 1 hora con los viriones de VHS-1 tratados previamente de este modo, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 %. Se calculó gráficamente la CI_{50} que fue de 25 nM en células Vero y 20 nM en HFF (A). La infectividad en ambas líneas celulares se inhibió completamente cuando los viriones se trataron previamente con dUY11 700 nM (B). Las barras de error representan intervalos de tres o más experimentos. Como se esperaba, los viriones tratados con dUY11 eran igualmente no infecciosos para células Vero o fibroblastos de prepucio humano.

Aunque dUY11 es un compuesto potente y no citotóxico que protege a los ratones de infección genital (véase las secciones siguientes), se sintetizaron y evaluaron otros dos compuestos basados en nucleósidos. Los compuestos modificados se denominan ddUY11 y aUY11 (véase la sección I). Los compuestos se sometieron a prueba en infecciones de células cultivadas. Tanto aUY11 como ddUY11 fueron aproximadamente tan potentes como dUY11 (tabla 1), y ninguno fue citotóxico.

Tabla 1. CI_{50} de aUY11, dUY11 y ddUY11 sobre la infectividad de VHS-1 en células Vero.

Compuesto	CI_{50} (μ M)
aUY11	0,075

dUY11	0,050
ddUY11	0,045

VI. dUY11 tiene un índice de seguridad superior a 7.500 y no tiene efectos citostáticos importantes

Dos series de experimentos revelaron que dUY1 no tiene efectos citotóxicos o citostáticos. En la primera serie, el medio recién preparado complementado con dUY11 se había reemplazado solo a las 30 horas durante un tratamiento total de 72 horas. Sin embargo, más tarde se descubrió que dUY11 se localiza en la membrana plasmática (figura 9). De esta manera, el número de moléculas de dUY11 por membrana plasmática disminuiría en la mitad después de cada ciclo de duplicación celular. Por lo tanto, se repitieron los análisis de citotoxicidad, pero añadiendo medio que contenía dUY11 recién preparado cada 24 horas (que es aproximadamente el doble de tiempo para estas células) durante una exposición total de 72 horas.

La figura 10 es un gráfico de líneas que muestra el número de células relativo representado frente al tiempo de exposición a dUY11. Las células Vero se infectaron simuladamente durante 1 hora, se lavaron, y se cubrieron con medio que contenía dUY11 0 (■), 7 (▲), 20 (●), 70 (□) o 150 (Δ) μM. 150 μM no es estable en medio durante largos periodos. El medio se reemplazó por medio recién preparado complementado con 0, 7, 20, 70 o 150 μM de dUY11 cada 24 horas (indicado por las flechas de bloque ascendentes). Las células viables no viables se contaron por exclusión del azul de tripano a las 24, 48 y 72 horas. Las células no viables representaron menos de un 4 % de las células totales para todas las muestras en todos los tiempos. Las barras de error representan intervalos de muestras por duplicado de un experimento, excepto para (*), donde representan intervalos de recuentos por duplicado de una muestra de un experimento. dUY11 no fue citotóxico y solo levemente citostático, incluso en concentraciones 7.500 veces por encima de su CI₅₀. De esta manera, el índice de seguridad (IS) es superior a 7.500, pero no se pudo calcular el valor debido a que no se pudo alcanzar un 50 % de citotoxicidad en cualquier concentración a la que se dUY11 estaba dispersado de forma homogénea en medio (hasta 70.000 nM), o incluso en concentraciones más altas (150.000 nM).

VII. Los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben la entrada vírica, pero no la unión.

La infectividad se inhibió tratando previamente viriones de VHS-1 con los derivados nucleosídicos anfipáticos antes de la infección. De esta manera, estos nucleósidos pueden inhibir la infectividad de VHS-1, por ejemplo, previniendo la unión del virión a las células. De forma alternativa, pueden alterar los viriones extracelulares (es decir, tienen actividades viricidas). Los viriones lisado no se unen a células. Se evaluó la unión de viriones de VHS-1 tratados previamente con dUY11. La figura 11 es un gráfico de barras e imágenes fotográficas que muestran la unión (A) e infectividad (B) de VHS-1. En estudios en paralelo, se trataron previamente KOS de VHS-1 radiomarcados con [35]S-metionina (aproximadamente 4×10^5 cpm en $2,5 \times 10^5$ UFP) (A) o no radiomarcados (B) sin fármaco (barra blanca), con dUY11 7 μM (barra rayada) o 100 mg/ml de heparina (barra negra) durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, las muestras se enfriaron en hielo. Se diluyeron los inóculos (1:20, 1:100) en medio libre de suero helado complementado con dUY11 7 μM, 100 mg/ml de heparina o no fármaco. Se infectaron células Vero con los viriones tratados previamente de este modo a 4 °C durante 1 hora, se lavaron tres veces con medio libre de suero helado y se lisaron. Los viriones unidos se cuantificaron por centelleo líquido. Las barras de error representan intervalos de tres experimentos (A). En base a estos resultados, dUY11 7 μM anuló la infectividad (figura 11B), pero no inhibió la unión del virión (figura 11A).

Posteriormente se evaluó el dUY11 para determinar su capacidad para afectar a la unión de alta afinidad. La figura 12 es un gráfico de líneas que muestra la competencia de la unión de VHS-1 a células incrementando la concentración de heparina. Se trató previamente VHS-1 radiomarcado con [35]S-metionina (aproximadamente $3,5 \times 10^5$ cpm en $2,5 \times 10^5$ UFP) con dUY11 7 μM (■) o no fármaco (●) durante 5 minutos a 37 °C. Los inóculos se enfriaron en hielo, y, a continuación, se diluyeron (1:10) en medio libre de suero helado con o sin dUY11 7 μM. Tras 15 minutos de adsorción sobre células Vero, se eliminaron por lavado los viriones no unidos. A continuación, los viriones unidos se lavaron adicionalmente durante 1 hora con medio complementado con de 0 a 1.000 mg/ml de heparina para retirar los viriones solo unidos por unión de baja afinidad. A continuación, se cuantificaron por centelleo líquido los viriones retirados por estos lavados. Las barras de error representan intervalos de dos experimentos. La heparina no pudo competir tan eficazmente con la unión de viriones de VHS-1 tratados previamente con dUY11 7 μM como con los no tratados, lo que indica que los primeros estaban mayoritariamente ligados por unión de alta afinidad (figura 12). De esta manera, dUY11 no es viricida y no bloquea tanto la unión de alta como de baja afinidad. Por lo tanto, los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben una etapa entre la unión de alta afinidad y la replicación del ADN vírico.

Los efectos de dUY11 sobre la entrada de VHS-1 se investigaron posteriormente. La entrada de VHS se puede evaluar mediante varios medios, incluyendo la evaluación de la entrada de VP 16 en la célula infectada. La VP16 es la única proteína de virión de VHS requerida para la activación de la transcripción del gen temprano inmediato (IE) de VHS. Por lo tanto, la entrada de VP16 se puede evaluar en células que contienen un gen indicador de la proteína de fluorescencia roja (RFP) recombinado en sus genomas celulares bajo el control de un activador de IE de VHS-1. La

expresión de la RFP después de la infección indica que la VP16 ha alcanzado el núcleo. Por lo tanto, también indica que el VHS ha entrado en la célula.

La figura 13 muestra imágenes representativas (A) y cuantificación (B) de la expresión de fluorescencia roja en células Vero que contienen un gen indicador de la proteína de fluorescencia roja (RFP) recombinado en sus genomas celulares bajo el control del activador de IE ICP0 de VHS-1. Las células se infectaron con viriones de KOS de VHS-1 tratados previamente con vehículo de DMSO (paneles a la izquierda) o dUY11 2 μ M (paneles a la derecha). En la figura 13A, se visualizaron las células 24 hdi por fluorescencia (paneles superiores) o luz visible (paneles inferiores). En la figura 13B, la cuantificación de células fluorescentes infectadas con viriones de KOS de VHS-1 inactivados frente a UV tratados previamente con dUY11 o no fármaco (recuentos de dos campos microscópicos con densidades celulares similares de un experimento, representativos de 7 experimentos).

Las células que expresaban la RFP bajo el control de un activador de IE de VHS-1 e infectadas con viriones de VHS-1 tratados previamente con 2 μ M de dUY11 (3,5 veces más baja que las concentraciones que no inhibieron la unión), no produjeron ninguna fluorescencia detectable (figura 13).

La única etapa conocida en entre ellas es la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular. Por lo tanto, dUY11 inhibe una etapa después la unión de alta afinidad, pero antes de la entrada del virión. La única etapa conocida en entre ellas es la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular.

VIII. Los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben la infectividad de varios virus con envoltura no relacionados de otro modo

Para probar si la diana de dUY11 se conserva entre virus que de alguna manera han conservado glucoproteínas, se sometió a prueba la actividad de dUY11 en dos cepas de VHS tipo 2 (VHS-2). La primera es una cepa aislada clínica y la otra una adaptada a laboratorio (cepas 186 y 333, respectivamente) Para someter a prueba si la diana de dUY11 se conserva solo en virus con envoltura lejanamente relacionados, se sometió a prueba la actividad de dUY11 en el virus de estomatitis vesiculosa (VEV) y Sindbis (SIN). Los VEV y SIN son virus de ARN con ninguna glucoproteína que se conozca que esté conservada con VHS-1 o -2. Las glucoproteínas de VEV y SIN también reconocen diferentes receptores que aquellos en VHS-1 o -2. La proteína G de VEV reconoce y se une a un lípido específico, fosfatidilserina, mientras que las glucoproteínas de SIN se unen al receptor de laminina de alta afinidad, una proteína ubicua de superficie. Al contrario que VHS-1 o -2, VEV y SIN se internalizan por fusión con membranas endosómicas tras los cambios conformacionales inducidos por pH en sus glucoproteínas de fusión. Estos cambios conformacionales exponen los péptidos de fusión, que, a continuación, se insertan en la membrana diana y desencadenan la fusión entre la membrana de envoltura vírica y la membrana celular.

La figura 14 es un gráfico de líneas que muestra la infectividad de la cepa KOS de VHS-1 (●), cepa 186 de VHS-2 (■), cepa 333 de VHS-2 (□), VEV (▲) o virus SIN (Δ) representada frente a la concentración de dUY11. Se incubaron los viriones (200 UFP) con dUY11 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,7 o 2 μ M durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, las células Vero se infectaron con los viriones tratados previamente de este modo durante 1 hora, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 %. Se calculó gráficamente la CI_{50} que fue 6 nM para VEV, 24 nM para VHS-1, 49 nM para la cepa 186 de VHS-2, 58 nM para SIN y 65 nM para la cepa 333 de VHS-2. Las barras de error representan intervalos de dos o más experimentos. dUY11 inhibió la infectividad de ambas cepas de VHS-2 con similar CI_{50} hacia VHS-1 (figura 14), lo que indica que la diana de dUY11 se conserva entre virus con composición lipídica de envoltura y glucoproteínas conservadas. También inhibió virus con envoltura lejanamente relacionados con similar CI_{50} , lo que indica que la diana de dUY11 también se conserva entre virus con proteínas de envoltura no conservadas. Por lo tanto, dUY11 inhibe una etapa de fusión vírica que se conserva entre virus con envoltura no relacionados de otro modo. Debido a que dUY11 previene la entrada de virus con envoltura no relacionados, pero no bloquea la unión de alta afinidad, se propone que la diana de dUY11 sea la fusión entre las bicapas de membrana lipídica de la envoltura y la célula.

IX. La principal diana de los derivados nucleosídicos anfipáticos es la envoltura vírica, no la membrana celular

La internalización vírica requiere la fusión entre dos membranas bicapa lipídica, la envoltura vírica y la membrana celular. Se inhibió la infectividad vírica cuando los viriones se trataron previamente con dUY11, lo que indica, de esta manera, que la envoltura vírica es una diana. Sin embargo, la membrana celular también puede ser una diana. En esta situación, los viriones tratados previamente con dUY11 podrían suministrar el fármaco a sitios diana en la membrana plasmática. A continuación, las células tratadas previamente deberían inhibir la infección de forma más eficaz que los viriones tratados previamente.

Las pruebas se realizaron para determinar si dUY11 preferencialmente selecciona como diana la envoltura vírica o la membrana celular. La figura 15 son gráficos de líneas que muestran la infectividad de KOS de VHS-1 representada frente a la concentración de dUY11. Se incubaron KOS de VHS-1 (200 UFP) con dUY11 0, 0,002, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,7, 2, 7, 20 o 70 nM durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, las células Vero se infectaron con viriones tratados previamente de este modo durante 1 hora, se lavaron y se cubrieron con medio complementado con FBS al

5 % y MC al 2 %. De forma alternativa, los inóculos no tratados se usaron para infectar células Vero no tratadas ($\blacktriangle$) o células Vero tratadas previamente a 37 °C durante hasta 60 minutos con dUY11 0, 2, 7, 20 o 70 μ M ($\bullet$). A continuación, las células infectadas no tratadas previamente se cubrieron con medio complementado con FBS al 5 % y MC al 2 % complementado con dUY11 0, 2, 7, 20 o 70 μ M. Se calculó gráficamente la CI_{50} que fue 20 nM para el tratamiento previo de virión (no visible en estas escalas) y 5,4 μ M para el tratamiento previo de células (**A**). La inhibición máxima es un 100 % para el tratamiento previo de virión o un 75 % para el tratamiento previo de células (**B**). El valor máximo en la escala del eje x es 7 μ M para (**A**) y 70 μ M para (**B**). Las barras de error representan intervalos de tres o más experimentos.

La infectividad vírica inhibió completamente solo cuando los viriones se trataron previamente antes de la infección (CI_{50} , 20 nM - figura 15). Por el contrario, el tratamiento previo de células redujo la infectividad de VHS-1, pero solo hasta un 75 % y en concentraciones 270 veces más altas (CI_{50} , 5,4 μ M). De forma consistente con los resultados presentados en la figura 3, el tratamiento de células con dUY11 después de la infección con viriones no tratados no tuvo ningún efecto sobre la replicación de VHS-1. Estos resultados indican que la membrana seleccionada como diana fundamentalmente por los derivados nucleosídicos anfipáticos es la envoltura vírica y demuestra adicionalmente que estos compuestos no inhiben la replicación vírica.

X. Los derivados nucleosídicos anfipáticos inhiben la infectividad de viriones producidos por células tratadas

Si los compuestos anfipáticos se pudieran insertar en celular por sí mismos, así como las membranas víricas, a continuación, también podrían inhibir la infectividad de los viriones descendientes producidos por células tratadas. La figura 9 muestra células infectadas simuladamente tratadas con dUY11 y contrateñidas con un colorante de membrana (PKH26). De hecho, el dUY11 se distribuye en las membranas plasmáticas e intracelulares, aunque sin filópodos, lo que indica que dUY11 no bloquea el tráfico de membrana. Los viriones producidos por células infectadas y tratados con dichos compuestos después de la infección, por lo tanto, no deberían ser tan infecciosos como los viriones producidos por células no tratadas. La figura 16A es un gráfico de líneas que muestra la reducción en la infectividad de viriones producidos por células tratadas con derivados nucleosídicos anfipáticos durante 24 horas y representada frente a la concentración de fármaco. Se infectaron células Vero con KOS de VHS-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 UFP/célula. Después de retirar el inóculo vírico, las células infectadas se trataron con 0, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,05, 1,5, 1,75 o 2 μ M de dUY11. Se recogieron las células 24 hdi y se evaluó la infectividad vírica por ensayos de placa estándar. Las barras de error representan intervalos de 3 o más experimentos. Los viriones producidos en presencia de dUY11 fueron 8 órdenes de magnitud menos infecciosos que los producidos por células no tratadas (figura 16A). A continuación, se repitieron los experimentos, pero limitando la exposición de las células infectadas a dUY11 a solo 1 hora, inmediatamente después de retirar el inóculo vírico (figura 16B). Después, se infectaron las células con VHS-1 y se añadió dUY11 a las células infectadas solo durante 1 h, antes de que se expresen las glucoproteínas de la envoltura. A continuación, se incubaron las células infectadas sin fármaco durante 22 h, a continuación, se evaluó la infectividad de los viriones descendientes. Los viriones procedentes de células tratadas con dUY11 fueron 6 órdenes de magnitud menos infecciosos que los procedentes de células no tratadas (Fig. 16B; CI_{50} , 3,9 μ M). Por lo tanto, dUY11 interacciona con factores celulares que existen previamente que se incorporan en viriones, tales como los lípidos de membrana.

Los efectos de dUY11 sobre la infectividad de viriones producidos por células tratadas fue independiente de si el virus que infecta era sensible (es decir, natural) o resistente a fármacos antivíricos convencionales. dUY11 tenía efectos inhibidores igualmente importantes sobre la infectividad de viriones producida por células infectadas con cepas de VHS-1 natural resistentes, resistentes a aciclovir o a ácido fosfonoacético (cepas timidina cinasa -TK- eliminada o PAA^{res}, respectivamente).

La figura 17 son gráficos de líneas que muestran la reducción en la infectividad vírica (o valores víricos) de viriones producidos por células tratadas con diferentes fármacos y representada frente a la concentración de ACV, PAA o dUY11. Se infectaron células Vero con 3 UFP/célula de VHS-1 WT ($\bullet$), resistente ACV- ($\blacktriangle$) o PAA ($\blacksquare$) durante 1 h, se lavaron, y se cubrieron con medio que contenía (A) ACV 0, 2,5, 5, 10, 25 o 50 μ M, (B) 0, 25, 50, 100, 250 o 500 mg/ml de PAA, o (C) dUY11 0, 0,5, 1,05, 2 o 10 μ M. Se recogieron las células 24 h después y se evaluó la infectividad vírica (o valores víricos) por ensayos de placa estándar. La reducción de la infectividad vírica (o valores víricos) se calculó dividiendo la infectividad de viriones producidos por células tratadas con diferentes fármacos por la infectividad de viriones producidos por células no tratadas. Las barras de error representan intervalos de dos experimentos.

Estos experimentos demuestran adicionalmente que los derivados nucleosídicos anfipáticos no seleccionan como diana la TK de VHS-1 o el sitio de unión a pirofosfato de la ADN polimerasa vírica (la diana de PAA) hacen la mayoría de los demás nucleósidos.

XI. Análisis *in vivo* de derivados nucleosídicos anfipáticos

Con el fin de determinar si un derivado de nucleósido anfipático descrito en el presente documento, inhibía la transmisión vírica, se usó un modelo de infección vaginal con un virus de transmisión sexual, VHS-2. Se infectaron vaginalmente grupos de cinco ratones con 10^{-3} o 3×10^3 viriones de VHS-2 infecciosos expuestos a dUY11 70 μ M o

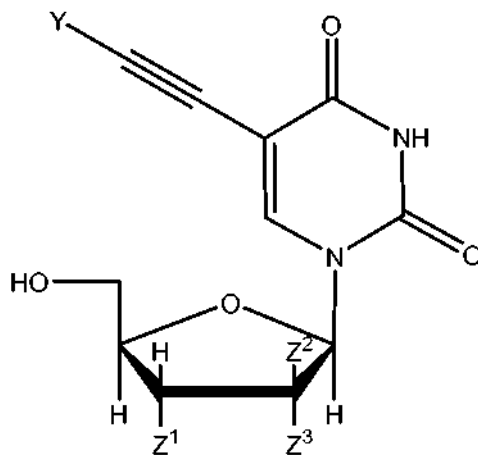
vehículo (figura 18A-E y la figura 19A-B). La figura 18A-E muestra una excreción vírica, promedio de las puntuaciones clínicas o pesos relativos, número acumulativo de ratones sintomáticos y muertos infectados con 1.000 (línea discontinua) o 3.000 (línea continua) viriones de VHS-2 infecciosos expuestos al vehículo (cuadrados blancos) o dUY11 (cuadrado negros). La figura 19A-B muestra fotografías de las regiones vaginal, perineal y ano de todos los ratones infectados. La figura 19A muestra ratones infectados con 3.000 viriones de VHS-2 infecciosos expuestos al vehículo (paneles a la izquierda) o dUY11 (paneles a la derecha). La figura 19B muestra ratones infectados con 1.000 viriones de VHS-2 infecciosos expuestos al vehículo (paneles a la izquierda) o dUY11 (paneles a la derecha). Todos los ratones infectados con viriones expuestos a vehículo excretaron $\sim 10^4$ viriones infecciosos entre los días 2 y 4 después de la infección, y niveles más bajos el día 8, y presentaron signos clínicos obvios de infección (figura 18A-D).

5 Todos los cinco ratones infectados con 3×10^3 viriones infecciosos, y tres de los ratones infectados con 10^3 , se tuvieron que sacrificar entre los días 7 y 9 debido a enfermedad avanzada (figura 18E y 19A-B). Ninguno de los diez ratones infectados con tanto 10^3 o 3×10^3 viriones expuestos a dUY11 excretó virus infeccioso detectable o mostró signos clínicos de infección. Por lo tanto, dUY11 protege de infección vaginal con VHS-2.

10

REIVINDICACIONES

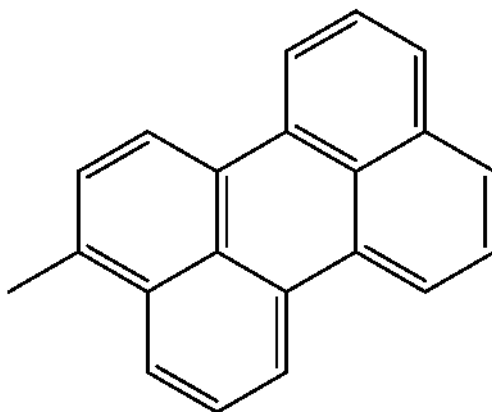
1. Un compuesto que comprende la fórmula IIIA



IIIA

5

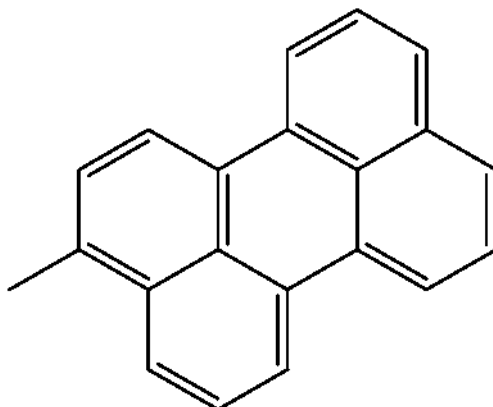
en la que Z^1 , Z^2 y Z^3 son hidrógeno, e Y es un grupo arilo que tiene la fórmula



10

en la que el grupo arilo está sustituido o no sustituido; o

en la que Z^1 y Z^2 son OH, Z^3 es hidrógeno, e Y es un grupo arilo que tiene la fórmula



15

en la que el grupo arilo está sustituido o no sustituido.

2. Una composición farmacéutica, preferentemente una composición tópica, que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 3. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso para prevenir que un virus infecte células, que comprende poner en contacto el virus con dicho compuesto.
- 10 4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el virus comprende, virus del herpes simple tipos 1 o 2 (VHS-1, VHS-2), poxvirus, virus de la gripe, VIH, virus de la leucemia de células T humanas (VLTH), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus humano (CMVH), virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (HVS-K), virus varicela-zóster (VVZ), virus de la hepatitis B, virus de hepatitis C, poxvirus, virus del Ébola, virus de Marburgo, virus paragripal, virus respiratorio sincitial humano, virus Hendra, virus Nipah, virus de la parotiditis, virus del sarampión, hantavirus, bunyavirus, virus de la fiebre del Valle del Rift, arenavirus, incluyendo virus sin nombre, virus de la rabia, virus de la encefalitis oriental, occidental y venezolana, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa y de San Luis, coronavirus (p.ej., virus SRAG) o virus de la rubéola; o en el que el virus es un virus con envoltura.
- 15 5. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso para prevenir que un virus infecte a un sujeto o para el tratamiento de un sujeto infectado con un virus, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho compuesto.
- 20 6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el compuesto se aplica a un foco infeccioso o un foco de infección potencial, p.ej. por vía tópica.
- 25 7. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el virus es de una enfermedad de transmisión sexual o una enfermedad respiratoria.
- 30 8. Un procedimiento para prevenir que un virus en el entorno infecte a un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende descontaminar el entorno con un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1.
9. Un procedimiento para inactivar un virus que comprende poner en contacto el virus que se va a inactivar con un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 para producir una vacuna.
- 35 10. Una vacuna que comprende el virus inactivado obtenido mediante el procedimiento de la reivindicación 9.

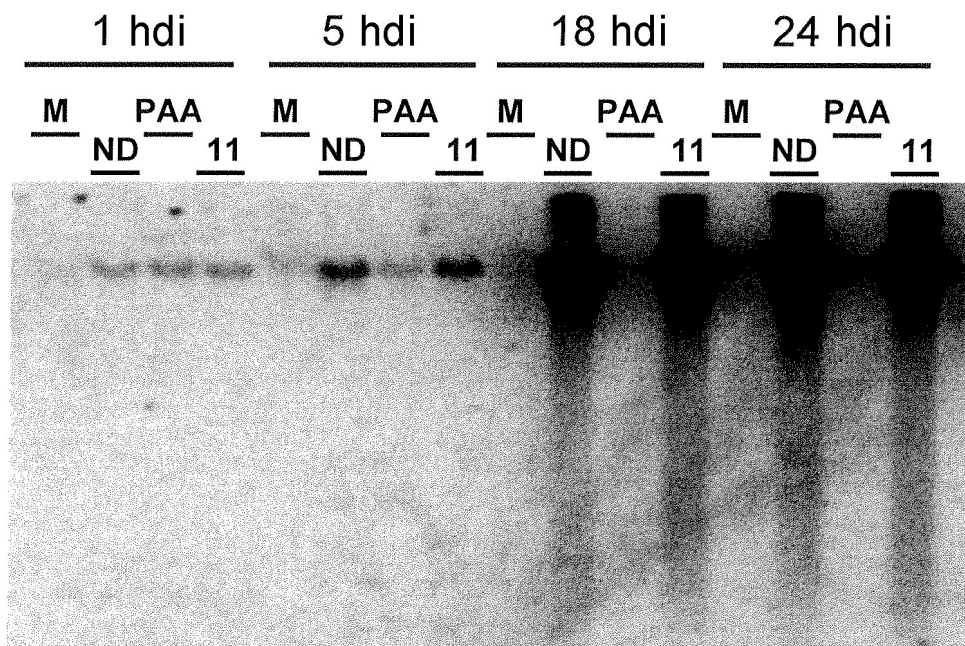


FIGURA 1

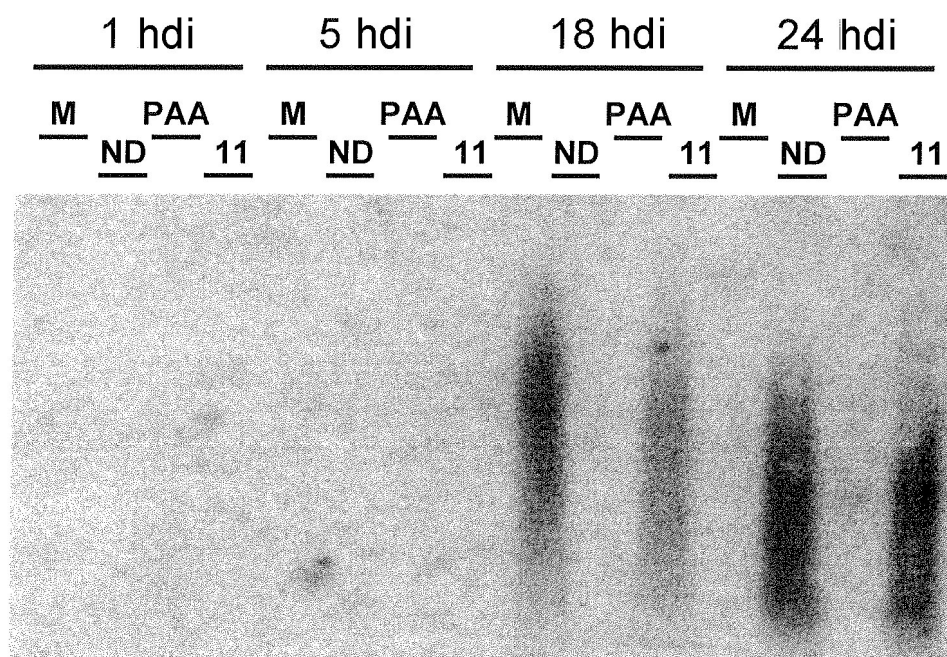


FIGURA 2

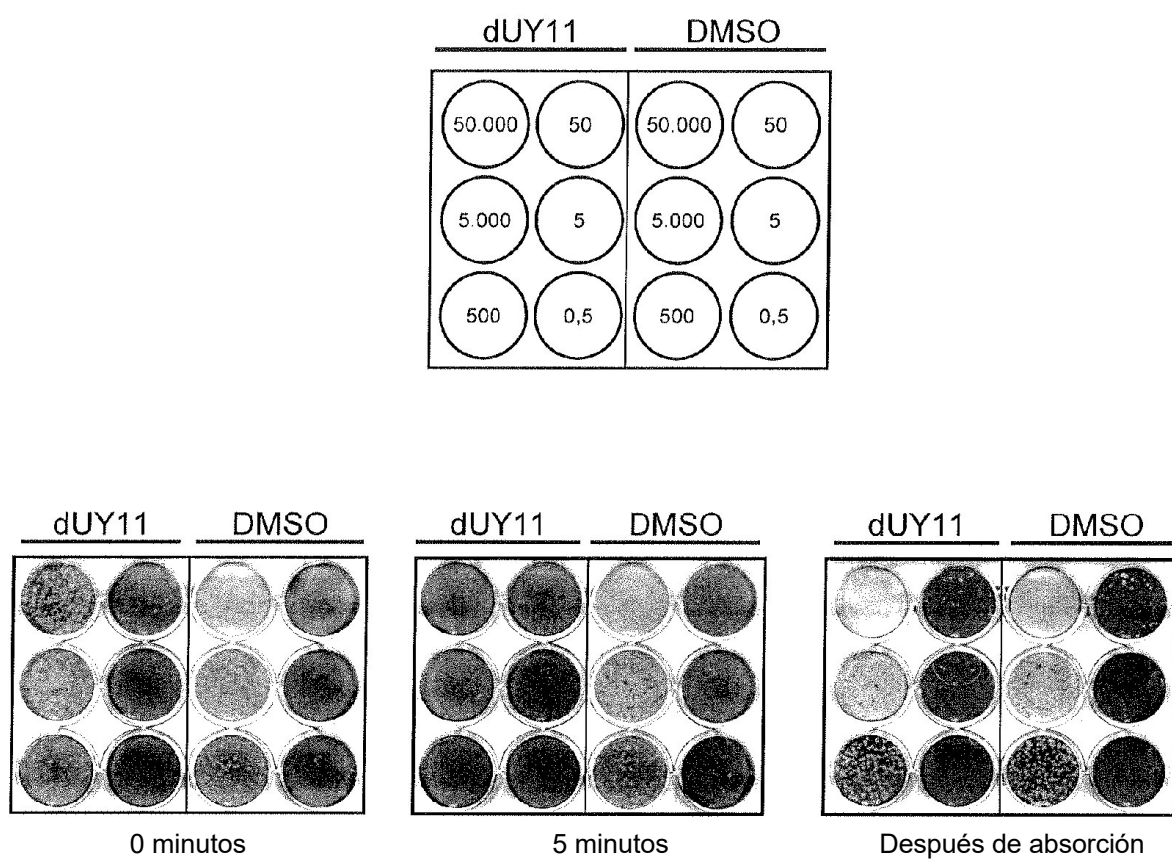


FIGURA 3

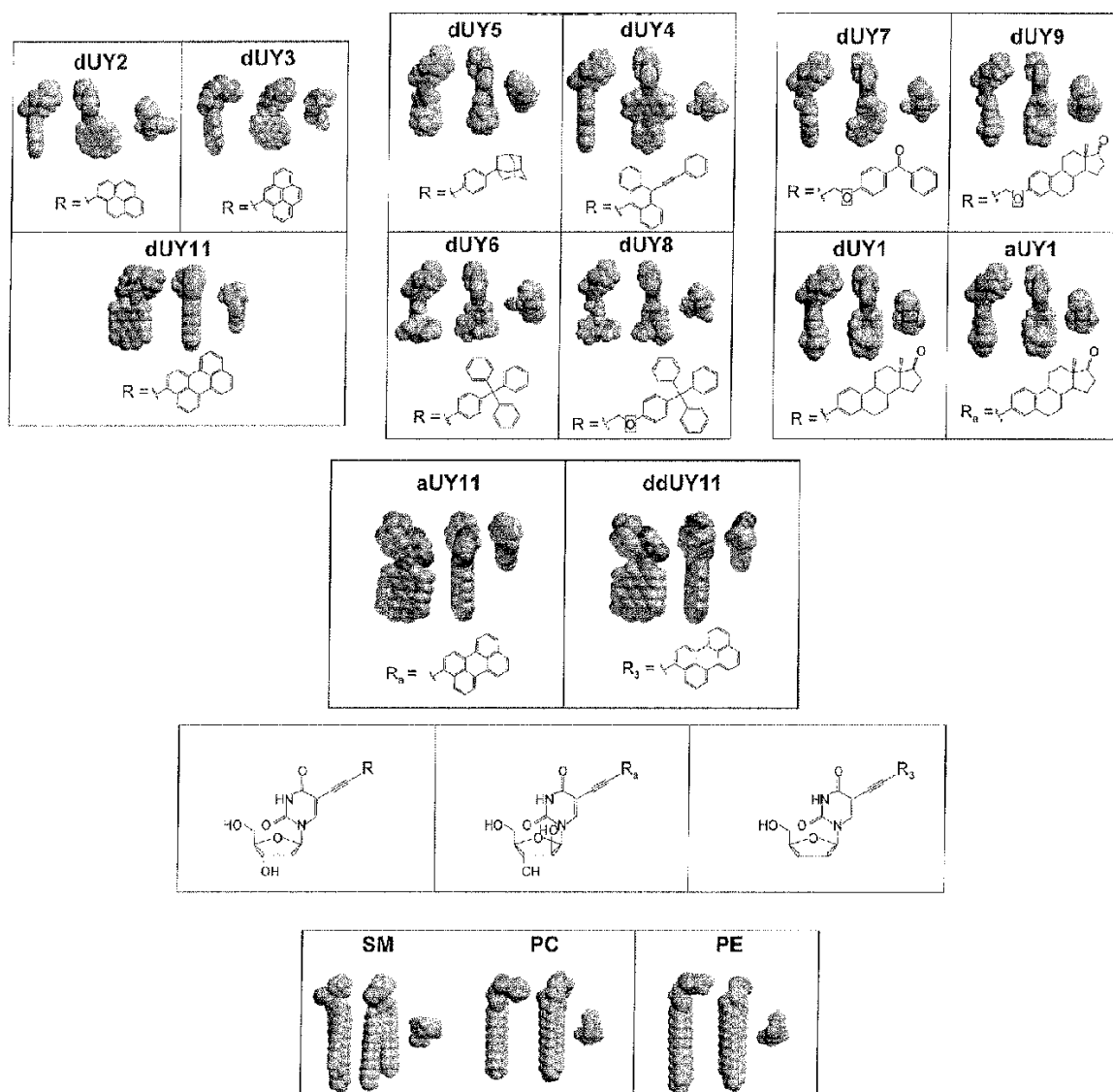


FIGURA 4

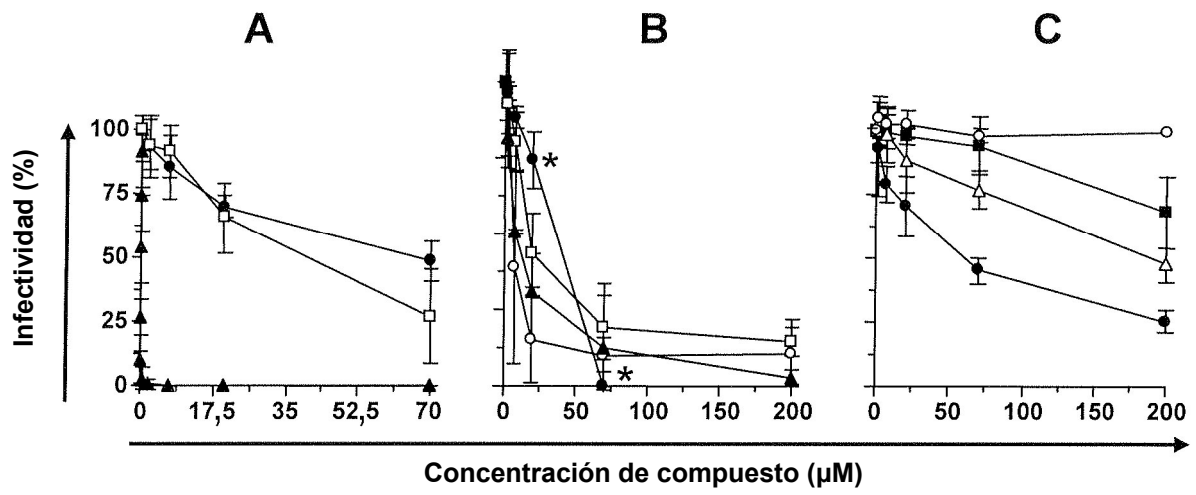


FIGURA 5

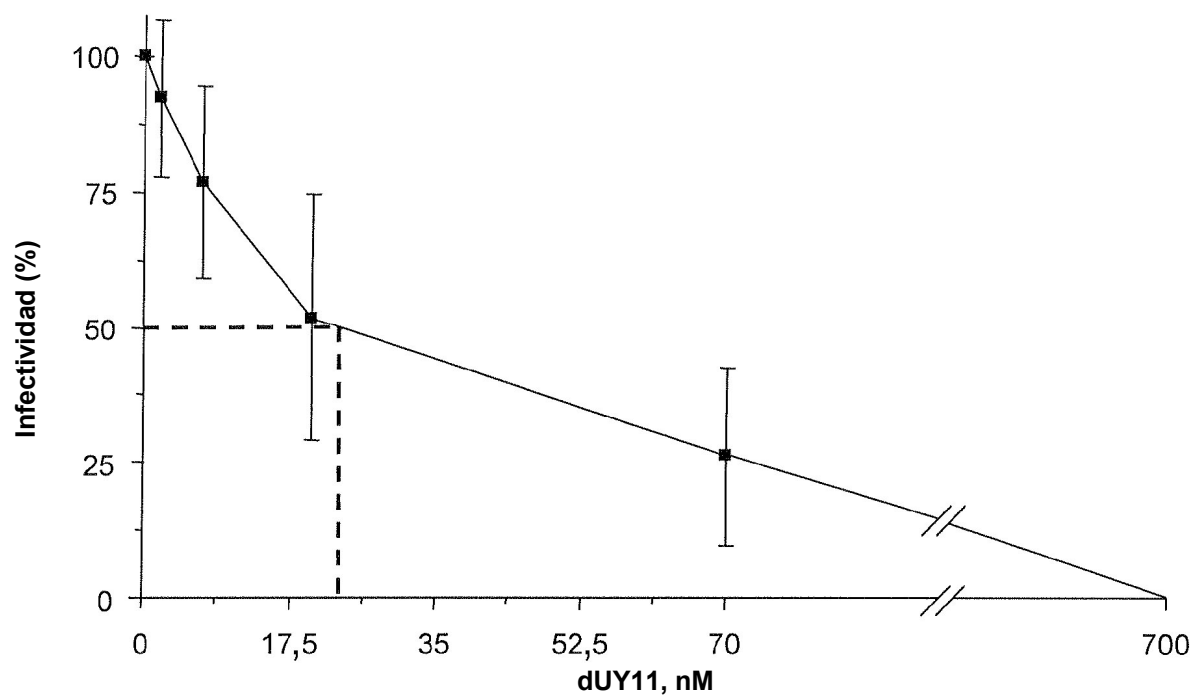


FIGURA 6

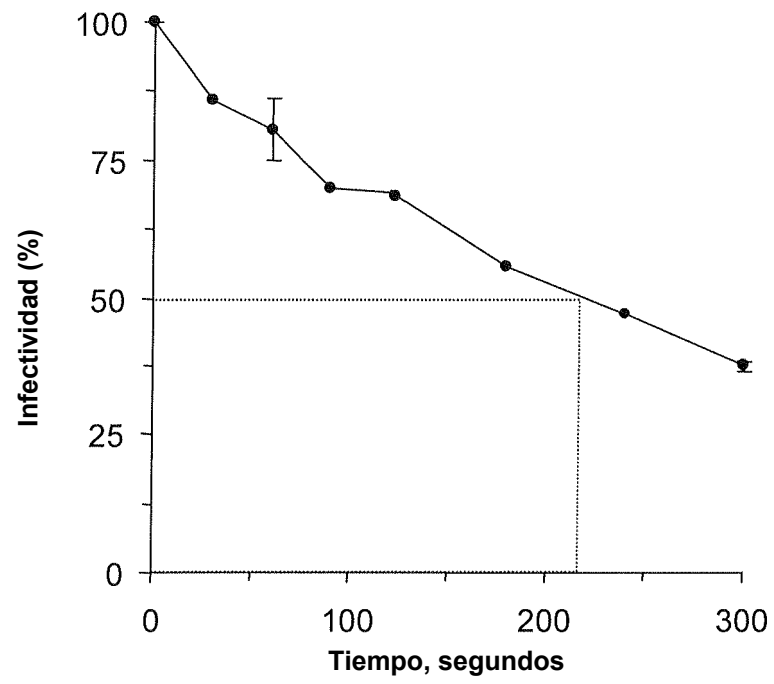


FIGURA 7

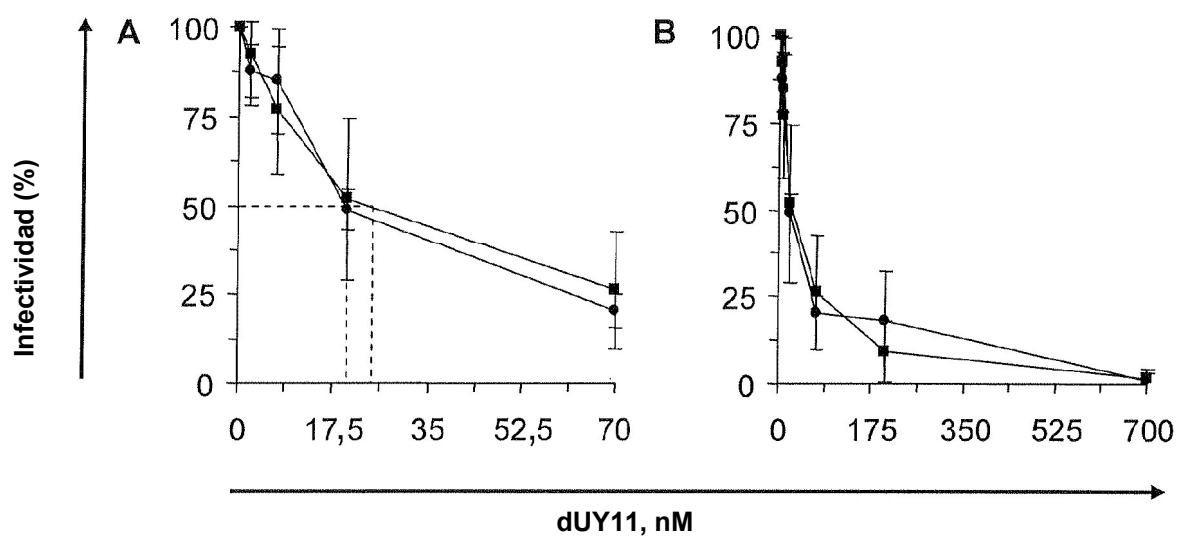


FIGURA 8

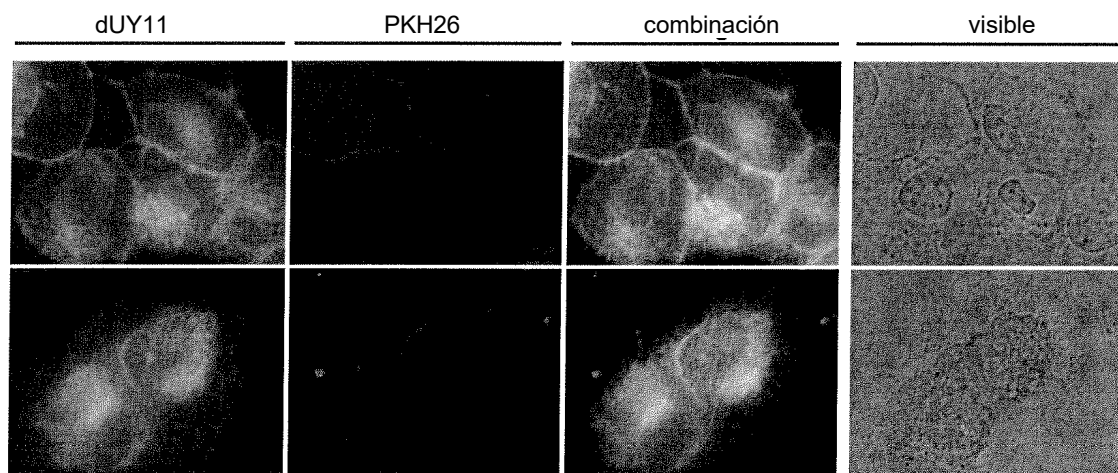


FIGURA 9

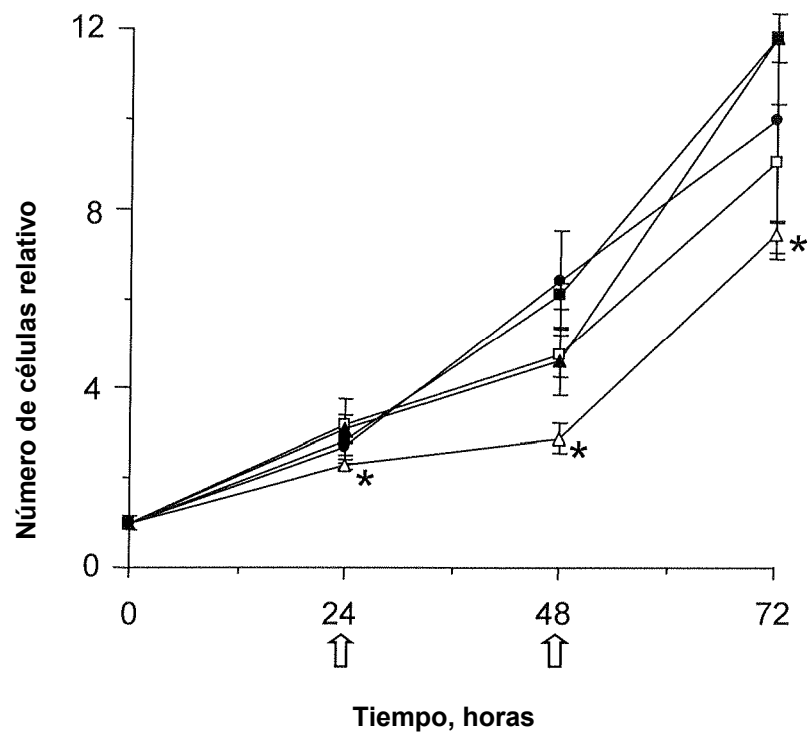


FIGURA 10

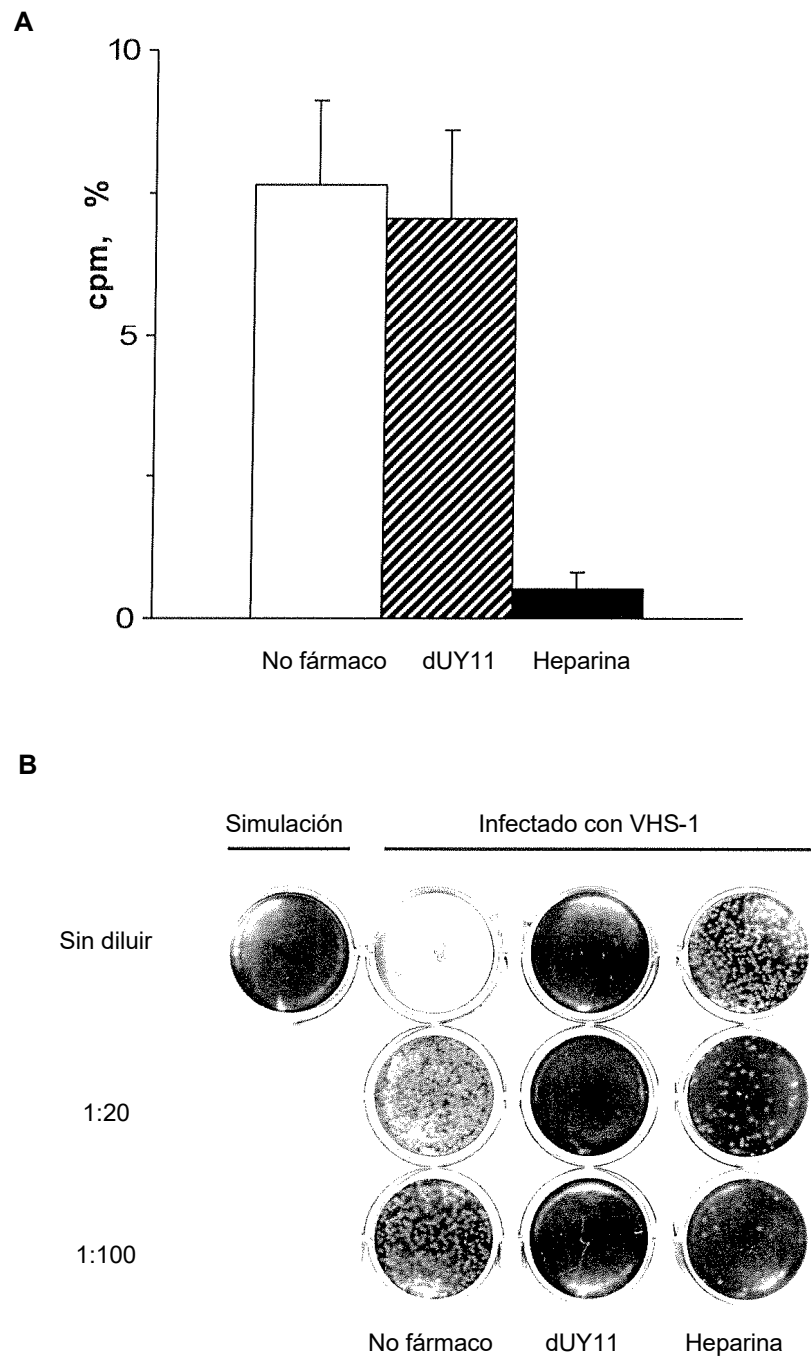


FIGURA 11

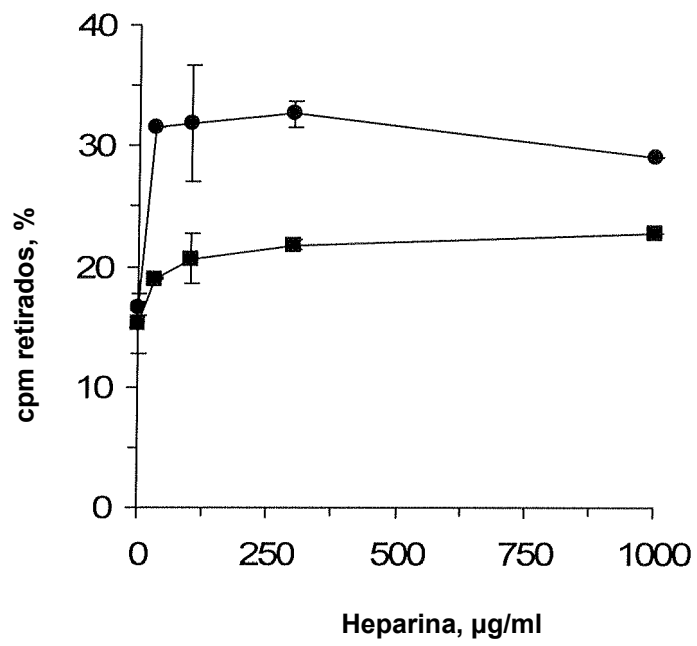


FIGURA 12

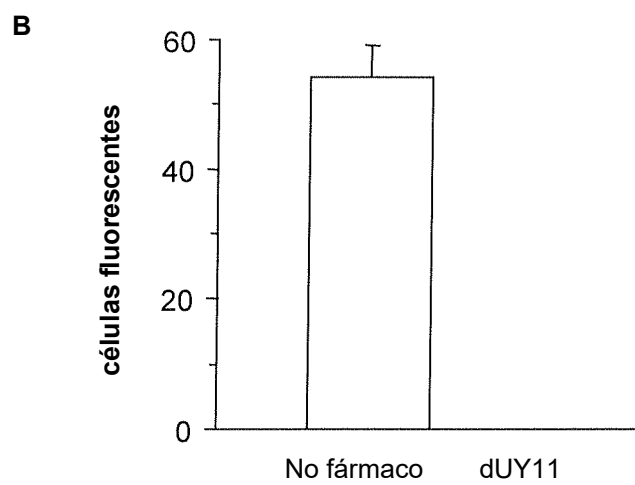
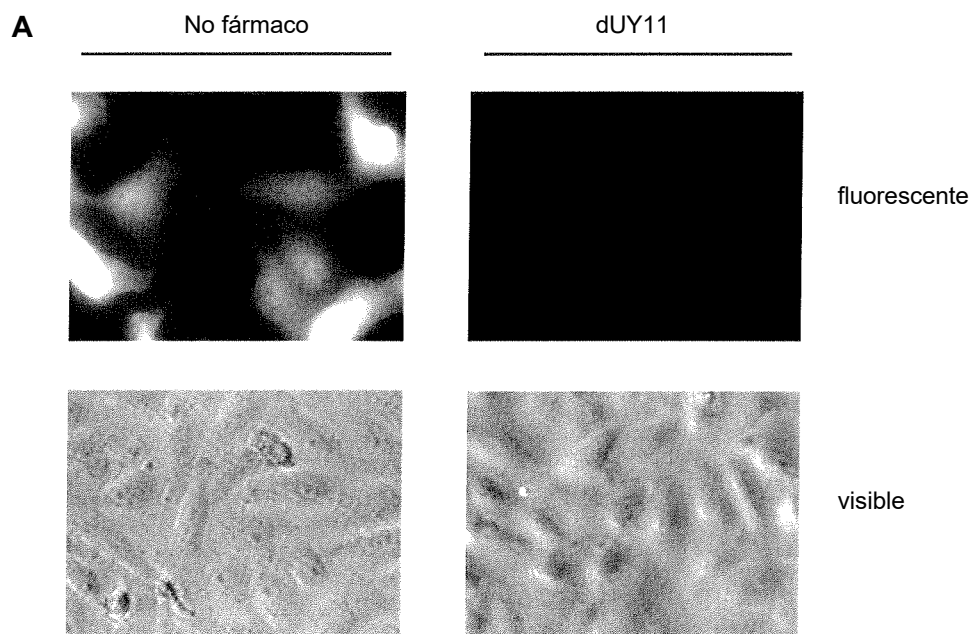


FIGURA 13

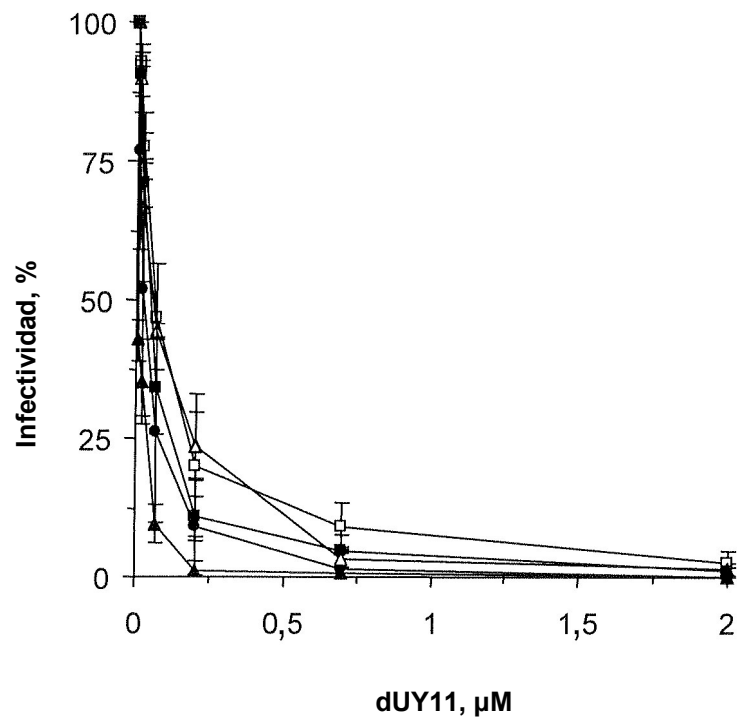


FIGURA 14

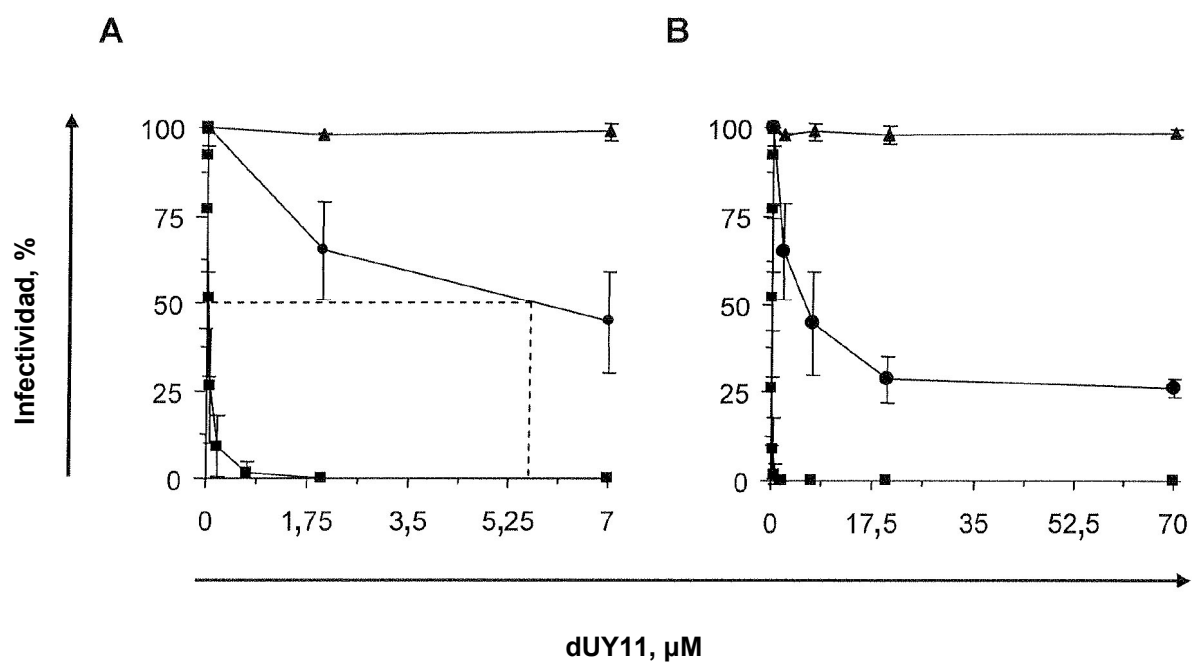


FIGURA 15

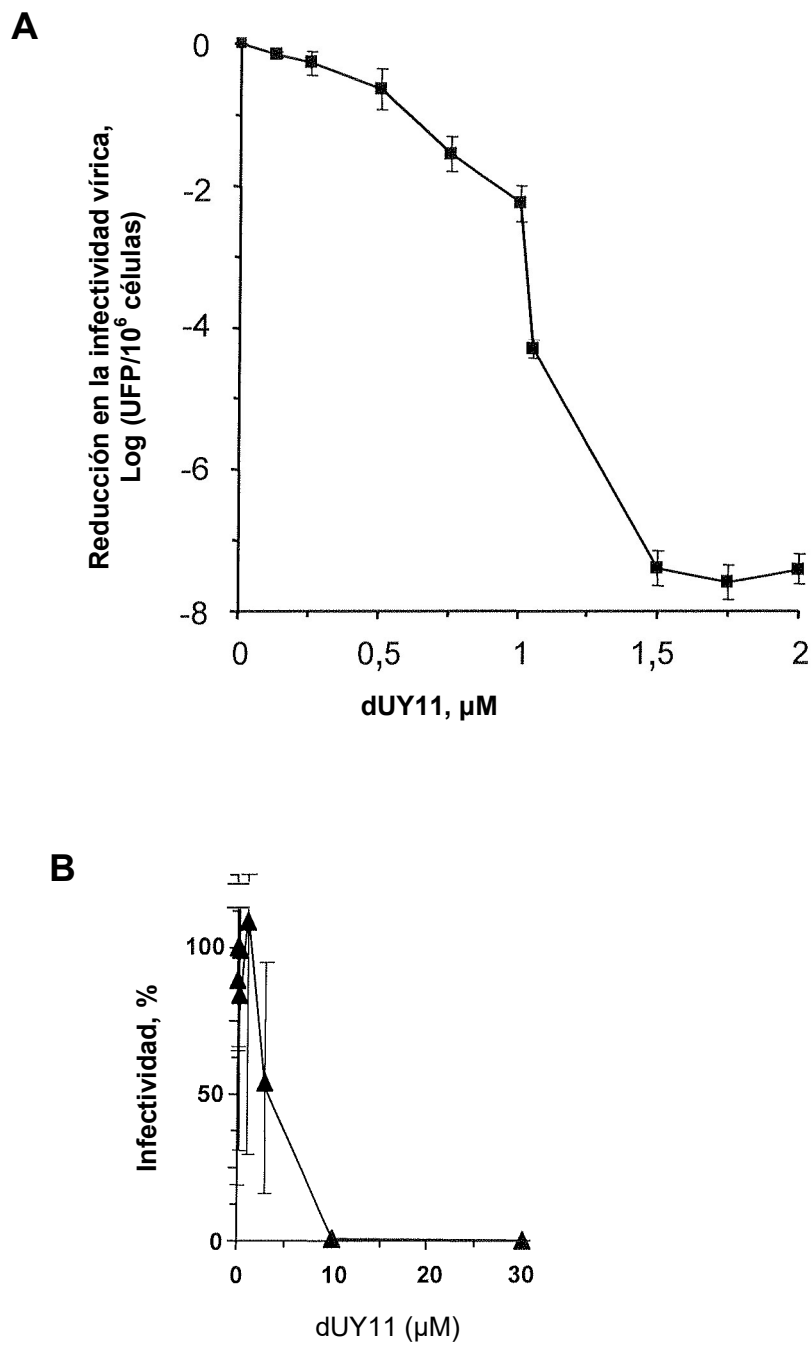


FIGURA 16

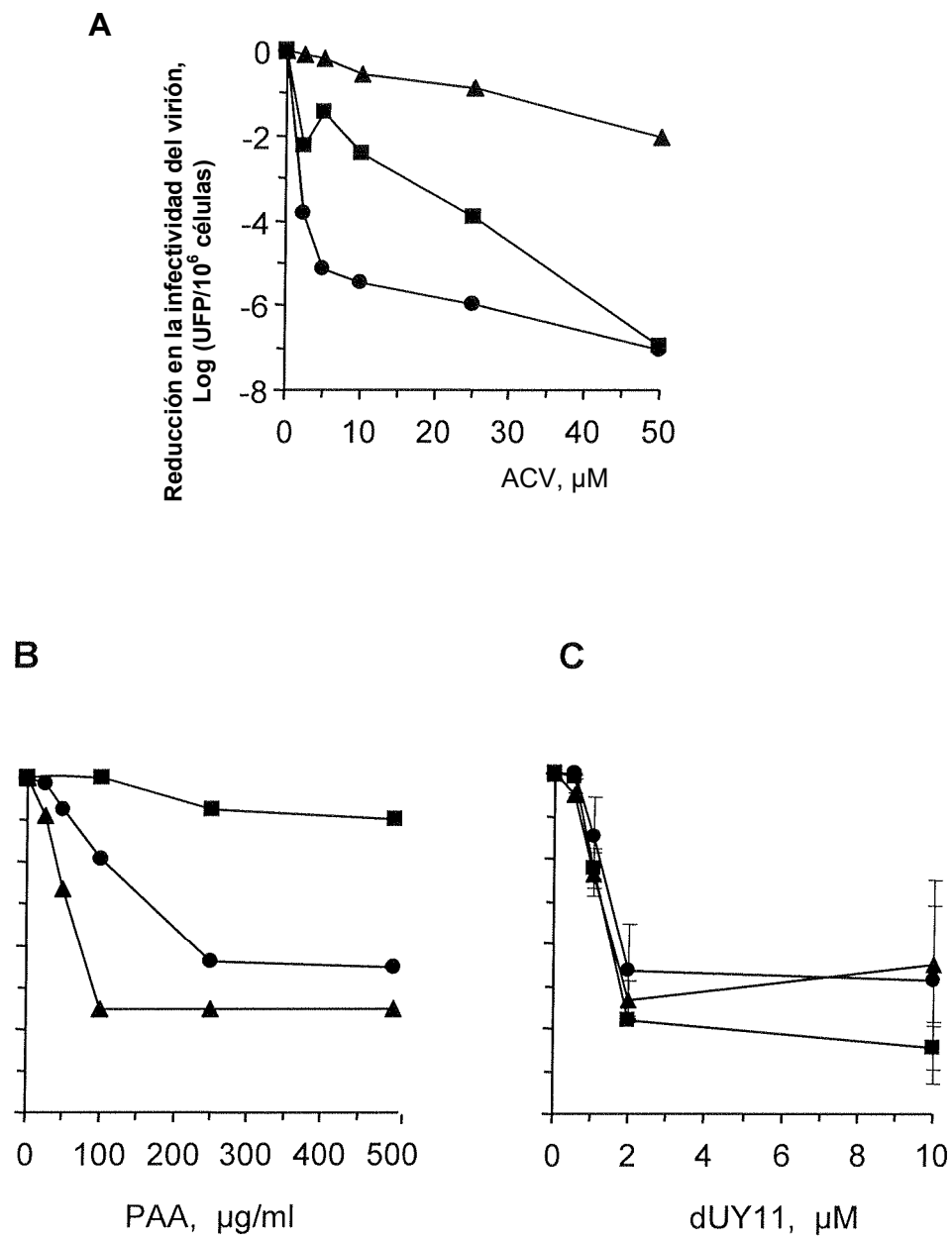


FIGURA 17

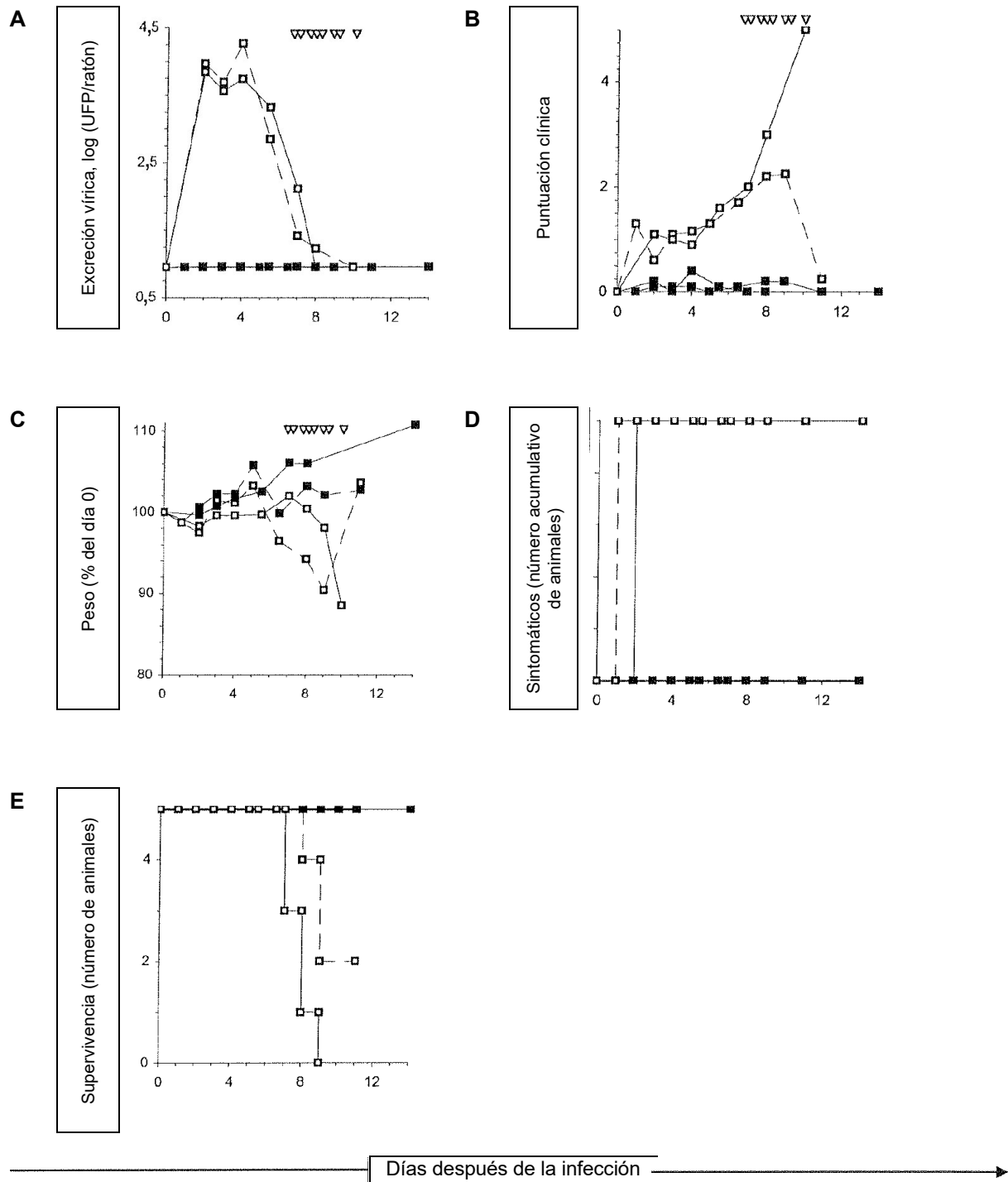


FIGURA 18

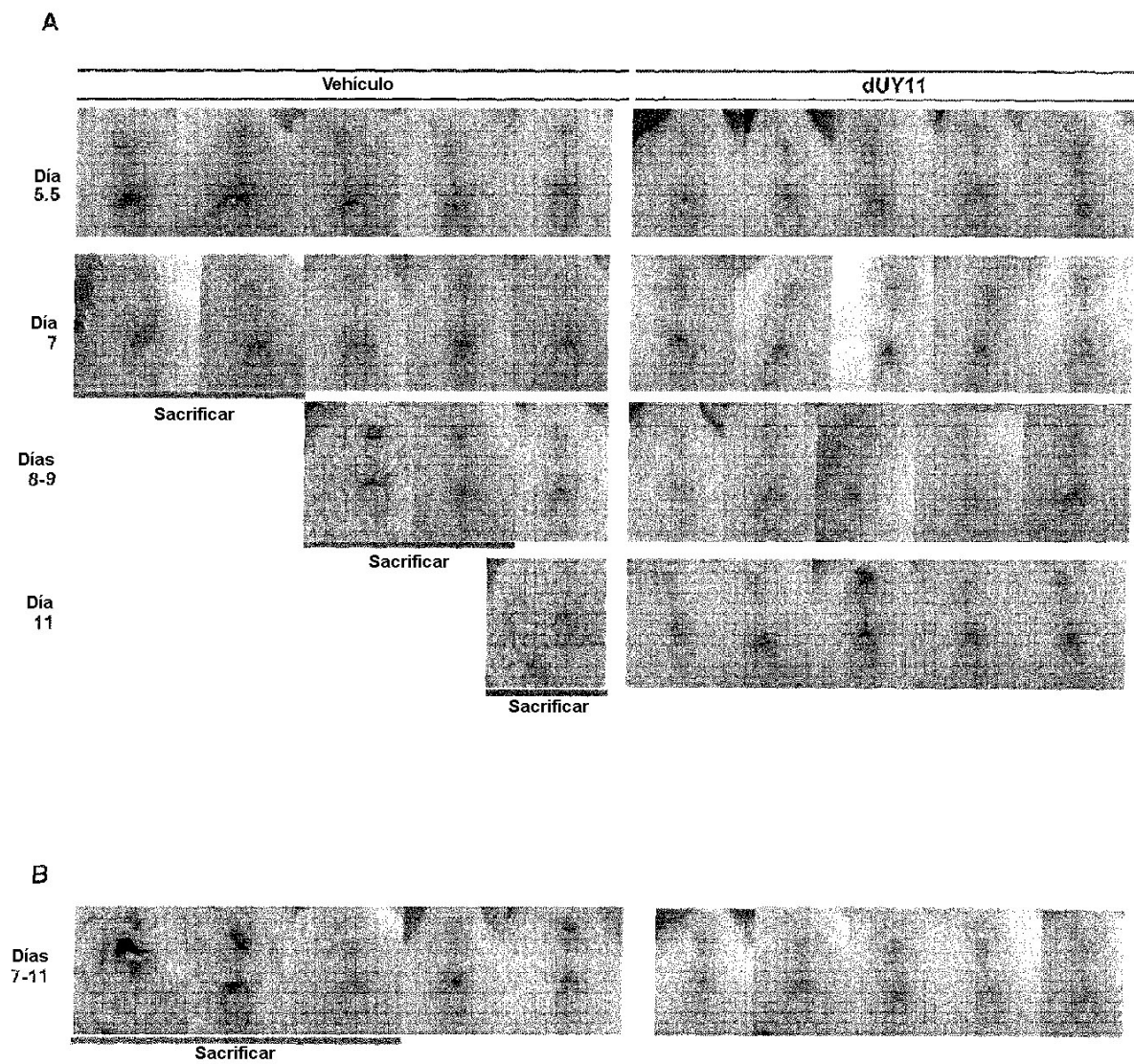


FIGURA 19