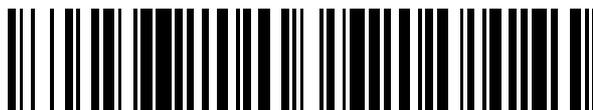


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 672**

51 Int. Cl.:

**C07D 277/46** (2006.01)

**A61K 31/426** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2005 E 05800142 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1789040**

54 Título: **Derivados halogenados de benzamida**

30 Prioridad:

**09.09.2004 US 608354 P**

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

**15.02.2016**

73 Titular/es:

**ROMARK LABORATORIES, L.C. (100.0%)  
3000 BAYPORT DRIVE SUITE 200  
TAMPA, FL 33607-8416, US**

72 Inventor/es:

**ROSSIGNOL, JEAN FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 559 672 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

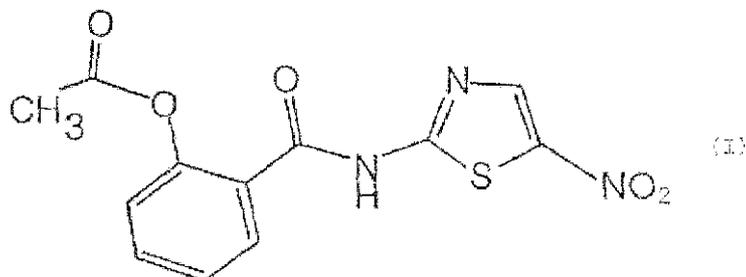
Derivados halogenados de benzamida

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a derivados halogenados de benzamida como se define en las reivindicaciones, y más específicamente, a derivados de benzamida caracterizados por mayor especificidad por patógenos virales y menos problemáticos para la microflora intestinal beneficiosa.

**Antecedentes de la invención**

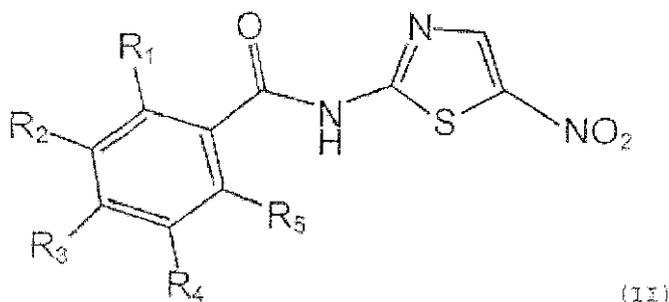
10 (2-(Acetoliloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida, el compuesto de fórmula (I), denominado también nitrotiazol, nitazoxanida, o NTZ, es conocido por su uso en el tratamiento y prevención de infecciones parasitarias, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, diarrea y otros problemas intestinales (patentes de EE.UU. Nos. 3.950.351, 4.315.018 y 5.578.621) incluyendo el tratamiento de trematodos (patente de EE.UU. No. 5,856.348). La preparación de NTZ se describe en la patente de EE.UU. No. 3.950.351. Se describen composiciones farmacéuticas mejoradas para suministro de NTZ en las patentes de EE.UU. Nos. 6.117.894 y 5.968.961.



15 Se ha postulado que, en bacterias anaerobias y protozoos, la NTZ exhibe un modo de acción basado en la reducción de su grupo nitro por nitroreductasas, y particularmente reacciones de transferencia de electrones dependientes de piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) que son esenciales para el metabolismo de la energía anaerobia. No se sabe nada actualmente con respecto al posible modo de acción de la NTZ para helmintos, sin embargo, las enzimas del transporte de electrones anaeróbico se consideran dianas potenciales, estando implicado el grupo 5-nitro en este mecanismo.

20

Los compuestos según la fórmula (II), en los que uno de  $R_{1-5}$  es  $-OH$  y siendo H el resto de  $R_{1-5}$ , se sabe que exhiben actividad antiviral, y son conocidos para tratamiento de enfermedades virales humanas tales como aquellas provocadas por citomegalovirus humano, varicela zoster, virus de Epstein Barr, HSV-I y HSV-II (patentes de EE.UU. Nos. 5.886.013 y 6.020.353).



25 Aunque potentes, estos compuestos no son selectivos solo para patógenos virales. Se describe que tienen excelente eficacia contra parásitos, bacterias y hongos. En la práctica, esto está asociado a un problema. A saber, en seres humanos y muchos animales, el intestino contiene poblaciones beneficiosas de microflora, que comprenden principalmente bacterias anaerobias. La administración oral de un amplio espectro de compuestos tales como los de la fórmula (II) mata la flora bacteriana del intestino, lo que puede conducir a complicaciones secundarias que incluyen diarrea que requiere tratamiento adicional.

30

I. Husain et al. (Journal of the Indian Chemical Society vol. 49 no. 9, 2005, páginas 3715-3723) describe 2-(3,5-salicilamino/cinnamido sustituido)-4,5-tiazoles sustituidos.

El documento WO 95/28393 describe derivados de benzamida y su uso como agentes antiparasitarios, anti-

bacterianos, antifúngicos, antivirales.

Por consiguiente, hay una necesidad de compuestos terapéuticos que sean más selectivos para patógenos virales. Lo más preferentemente, estos compuestos deben poseer actividad antiviral, pero estar desprovistos sustancialmente de actividad antibacteriana y antiparasitaria, por lo menos hasta el punto de evitar efectos perjudiciales sobre la beneficiosa microflora intestinal cuando se administran oralmente.

Esta necesidad, y más, se consiguen por la presente invención como se define en las reivindicaciones, como estará claro para uno de experiencia media al leer la siguiente descripción y ejemplos.

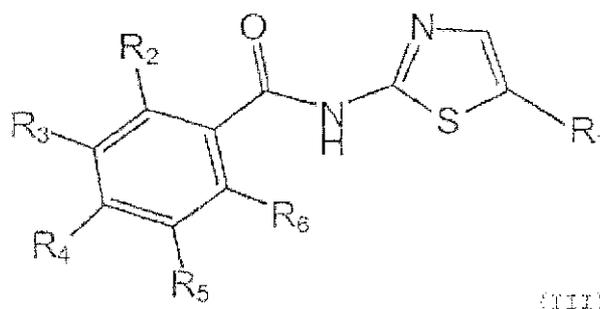
### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a derivados de benzamida antivirales que son más selectivos para patógenos virales, y en consecuencia causan reducidos efectos perjudiciales en la beneficiosa microflora intestinal cuando se administran oralmente.

En un primer aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones se realiza sorprendentemente reemplazando el sustituyente nitro, que se ha creído hasta ahora que era la clave para la actividad de la NTZ, por un átomo de halógeno. Esta sustitución se puede realizar en cualquiera de los 2-benzamido-5-nitrotiazoles terapéuticamente efectivos conocidos (en los que el anillo bencénico puede estar sustituido de diversas maneras). Sorprendentemente, los nuevos compuestos halogenados conservan sus propiedades antivirales, pero carecen de actividad contra la microflora intestinal bacteriana cuando se administran oralmente.

Los ejemplos de estos conocidos 2-benzamido-5-nitro-tiazoles, que son análogos de los compuestos de la presente invención como se define en las reivindicaciones sólo difieren en que según la presente invención el grupo nitro se retira y se sustituye por un átomo de halógeno, se describen ampliamente en las anteriormente referenciadas patentes de EE.UU., y en la patente de EE.UU. No. 5.886.013 en particular, siendo incorporada aquí su descripción como referencia.

Se describen aquí adicionalmente compuestos de (5-halo-2-tiazolil)benzamida según la fórmula (III):



en la que

R<sub>1</sub> es un átomo de halógeno, preferentemente F, Cl, Br, o I, más preferentemente Cl o Br, lo más preferentemente Br, y

R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, aciloxi (preferentemente acetoxi o propionoxi), nitro, halógeno, -C(O)R<sub>7</sub>, en la que R<sub>7</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o, aromático (preferentemente fenilo o bencilo no sustituido o sustituido), incluyendo sales e hidratos de estos compuestos.

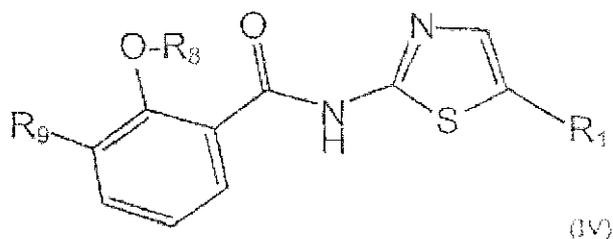
Preferentemente, uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es hidroxilo.

Preferentemente, por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son distintos de hidrógeno, y más preferentemente por lo menos dos de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son distintos de hidrógeno.

Dos R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> adyacentes pueden formar juntos un anillo de bencilo.

Preferentemente, R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> incluyen no más de un aciloxi y no más de un halógeno.

Se describen aquí adicionalmente compuestos antivirales según la fórmula (IV):



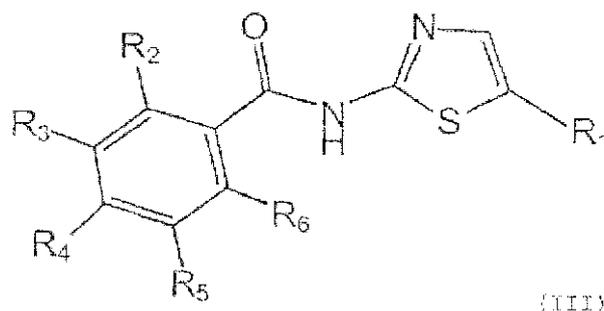
en la que R<sub>1</sub> es un átomo de halógeno, R<sub>8</sub> es -C(O)R<sub>10</sub>, en la que R<sub>10</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y R<sub>9</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, incluyendo sales e hidratos de estos compuestos.

5 Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas antivirales que comprenden un compuesto de Fórmula (III) o (IV) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe adicionalmente un método para tratar o prevenir una infección viral en un sujeto animal o humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del compuesto antiviral según la Fórmula (III) o (IV) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

#### 10 Descripción detallada

Los compuestos de la presente invención son como se define en las reivindicaciones. Se describen aquí adicionalmente los compuestos según la fórmula (III):



en la que

15 R<sub>1</sub> es un átomo de halógeno, preferentemente F, Cl, Br, o I, más preferentemente Cl o Br, lo más preferentemente Br, y

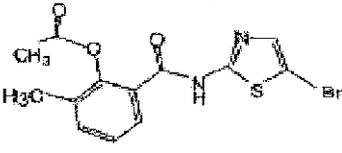
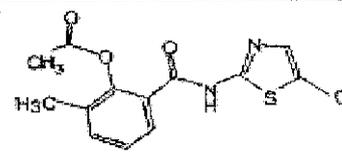
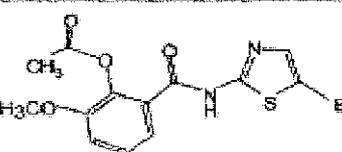
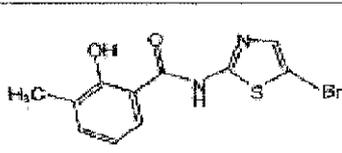
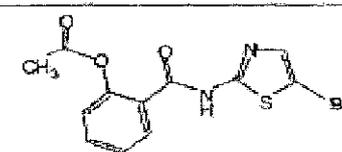
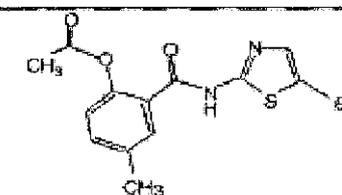
R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, aciloxi (preferentemente acetoxi o propionoxi), nitro, halógeno, -C(O)R<sub>7</sub>, en la que R<sub>7</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, o, aromático (preferentemente fenilo o bencilo, que puede estar sustituido adicionalmente), incluyendo sales e hidratos de estos compuestos.

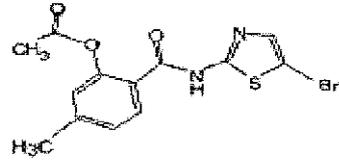
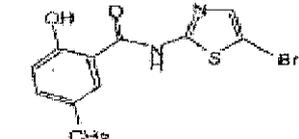
20 Preferentemente, uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es hidroxilo.

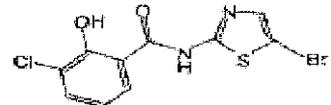
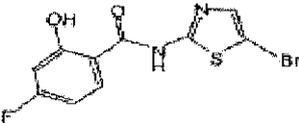
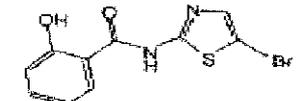
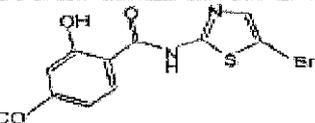
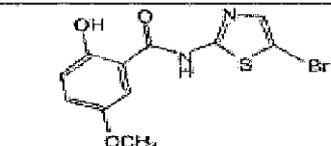
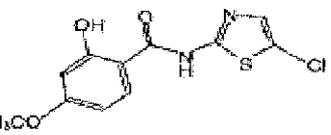
Preferentemente, por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son distintos de hidrógeno, y más preferentemente por lo menos dos de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son distintos de hidrógeno.

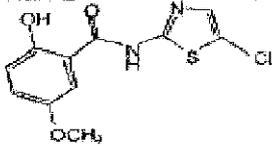
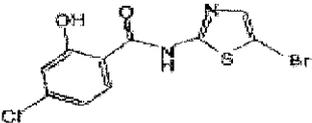
Dos R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> adyacentes pueden formar juntos un anillo de bencilo.

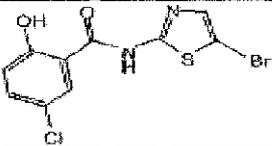
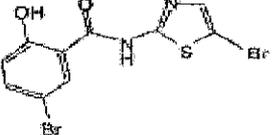
25 Preferentemente, R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> incluyen no más de un aciloxi y no más de un halógeno. Los compuestos según la presente invención se ilustran por la siguiente lista no limitante que también contiene los compuestos RM-4820, RM-4821 y RM 4822 que no son según la presente invención.

Número de código	Estructura	Peso molecular	Fórmula molecular
RM-4803		355,21	$C_{13}H_{13}BrN_2O_3S$
RM-4804		310,75	$C_{13}H_{11}ClN_2O_3S$
RM-4806		371,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_4S$
RM-4819		313,17	$C_{11}H_9BrN_2O_3S$
RM-4820		341,18	$C_{12}H_9BrN_2O_3S$
RM-4821		355,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_3S$

RM-4822		355,21	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
RM-4826		313,17	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S

Número de código	Estructura	Peso molecular	Fórmula molecular
RM-4827		333,59	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
RM-4831		317,13	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> BrFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
RM-4832		299,14	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
RM-4833		329,17	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
RM-4834		329,17	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
RM-4835		284,72	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S

RM-4836		284, 72	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
RM-4838		333, 59	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S

Número de código	Estructura	Peso molecular	Fórmula molecular
RM-4839		333, 59	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
RM-4840		378, 04	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S

Los ejemplos preferidos de compuestos dentro de la Fórmula (III) como se define en las reivindicaciones incluyen:

2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4803);

5 2-(hidroxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4819);

Se describen adicionalmente los compuestos

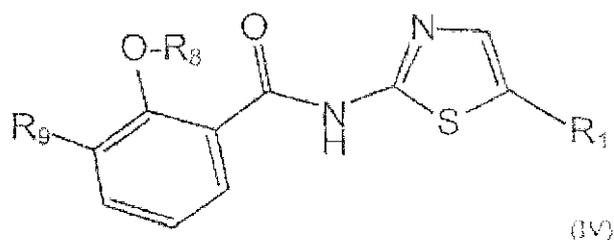
2-(acetoliloxi)-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4820);

2-(acetoliloxi)-5-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4821); y

2-(acetoliloxi)-5-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4822).

10 Se ha descubierto adicionalmente que los compuestos con un sustituyente hidroxilo en la posición orto del anillo bencénico tienen buena eficacia. De este modo, de entre los compuestos ilustrativos anteriores, se prefieren los siguientes compuestos: RM-4819, RM-4826, RM-4827, RM-4831, RM-4832, RM-4833, RM-4834, RM-4835, RM-4836, RM-4838, RM-4839, RM-4840.

Se describen adicionalmente compuestos de fórmula (IV):



15

en la que:

R<sub>1</sub> es halógeno, preferentemente F, Cl, Br, o I, más preferentemente Cl o Br, lo más preferentemente Br,

R<sub>8</sub> es -C(O)R<sub>10</sub>, en la que R<sub>10</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. R<sub>10</sub> incluye metilo, etilo, propilo y butilo, incluyendo sus isómeros.

Se prefiere metilo, por lo que el sustituyente de benzamida es acetoliloxi, y

R<sub>9</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. Se prefieren metilo y metoxi. Metilo es el más preferido.

Los ejemplos de compuestos dentro de la Fórmula (IV) incluyen:

2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4803);

5 2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-cloro-2-tiazolil)benzamida (RM4804); y

2-(acetoliloxi)-3-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4806).

Las composiciones como las que se describen aquí se pueden formular como formas de dosificación sólidas o líquidas, o como pastas o pomadas, y pueden contener opcionalmente ingredientes activos adicionales.

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, que no está particularmente limitado, e incluye una amplia gama de vehículos conocidos por los de experiencia media en la técnica, e incluyen agentes humectantes o dispersantes (patente de EE.UU. 5,578,621), derivados de almidón (patente de EE.UU. 5,578,621), excipientes, y similares. Las realizaciones de comprimidos puede comprender opcionalmente un revestimiento de una sustancia que constituye un revestimiento entérico, es decir, un  
15 revestimiento que es sustancialmente insoluble en la secreción gástrica pero sustancialmente soluble en los fluidos intestinales.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos según la Fórmula (III) o (IV) se formulan preferentemente para la administración oral y están opcionalmente en la forma de un líquido, por ejemplo una emulsión o una disolución o una suspensión en agua o en aceite tal como aceite de cacahuete, u otro líquido. Las formulaciones de disoluciones micelares no acuosas se pueden preparar según el método descrito en la patente de  
20 EE.UU. 5.169.846. Alternativamente, los comprimidos se pueden fabricar, por ejemplo, mediante la realización de las siguientes etapas: granulación húmeda; secado; y compresión. El revestimiento de película se realiza generalmente con disolventes orgánicos.

La expresión "antiviral selectivo" como se usa aquí quiere decir que, en dosis eficaces para la prevención o tratamiento de una enfermedad viral, la actividad es más antiviral que antibacteriana, antifúngica, o antiparasitaria, y la flora intestinal del sujeto no se altera hasta los niveles esperados con antibióticos de amplio espectro.  
25

El tratamiento antiviral preferido o las dosis profilácticas de los compuestos de la presente invención como se define en las reivindicaciones puede depender del peso del sujeto, y se puede inferir por uno de experiencia media sin excesiva experimentación por referencia a los siguientes ejemplos, que se describen con propósitos de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

### 30 **Ejemplo 1: Ensayo contra virus**

Métodos

Virus no hepáticos

35 Cultivos celulares y tratamientos. Células de carcinoma laríngeo HEp-2, células renales de mono 37RC, MA104 y VERO, células renales caninas Madin-Darby (MDCK) y de adenocarcinoma mamario (A72), se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, en medio RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), complementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10%, glutamina 2 mM y antibióticos. Los compuestos disueltos en disolución patrón de DMSO (50 mg/ml) se diluyeron en medio de cultivo y se añadieron a células infectadas inmediatamente después de 1 hora de periodo de adsorción. Los compuestos se mantuvieron en el medio durante la duración del experimento. Los controles recibieron igual cantidad de diluyente de DMSO. Cada concentración de cada compuesto se ensayó por  
40 duplicado y cada experimento se repitió dos veces.

Infección de virus y titulación. Se utilizaron los siguientes virus: Influenza A: cepa Puerto rico (PR8); Paramixovirus (Parainfluenza): virus Sendai (SV); Rhabdovirus: virus de estomatitis vesicular (VSV); Rotavirus: rotavirus de simio SA-11 (SA-11); virus herpes simplex de tipo 1: cepa F1 (HSV-1); Coronavirus: cepa coronavirus canino S-378 (CCoV). Se infectaron monocapas de células confluentes con virus de influenza A (células MDCK) o parainfluenza SV (células 37RC) durante 1 h a 37°C con una multiplicidad de infección (m.o.i) de 5 HAU (unidades hemoaglutinantes)/10<sup>5</sup> células. Alternativamente, se infectaron monocapas de células confluentes con HSV-I (células HEp-2), VSV (células MA104), CCoV (células A72) o Rotavirus SA-11 (células MA104) durante 1 h a 37°C con una m.o.i de 5 PFU (unidades que forman placa/10<sup>5</sup> células para HSV-I, VSV y CCoV y 1 PFU/10<sup>5</sup> células para SA-11. Después del periodo de adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas celulares se lavaron tres veces con  
50 disolución salina de tampón de fosfato (PBS). Las células se mantuvieron a 37°C en medio de cultivo apropiado que contiene FCS al 2% en presencia del compuesto de ensayo o diluyente de control. El rendimiento de virus se determinó 24 horas después de la infección (p.i.) por titulación de hemaglutinina (WSN; PR8, SV y SA-11) o ensayo de CPE al 50% (VSV, HSV-I, y CCoV), según procedimientos estándar (Amici, C., Belardo, G., Rossi, A. & Santoro,

- M.G. Activation of I $\kappa$ B kinase by Herpes Simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. J. Biol. Chem. 276, 28759-28766 (2001) y Bernasconi, D., Amici, C., La Frazia, S., Ianaro, A. & Santoro, M.G. The I $\kappa$ B kinase is a key factor in triggering Influenza A virus-induced inflammatory cytokine production in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. 280, 24127-24134 (2005)). Toxicidad celular. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a MTT formazan (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para el ensayo de MTT, se extrajo MTT reducido (formazan) de células añadiendo 100  $\mu$ l de isopropanol ácido que contiene Triton X-100 al 10%, y se midió la absorbancia de formazan en un lector de microplaca de ELISA a dos diferentes longitudes de onda (540 y 690 nm).

Virus de hepatitis B

- 10 Se realizaron análisis anti-virus de la Hepatitis B (HBV) y una evaluación de la citotoxicidad en un ensayo de 9 días en la línea celular de hepatoblastoma humano que produce crónicamente HBV, 2.2.15, como se describió previamente (Korba, B.E., & Gerin, J.L. Use of a standardized cell culture assay to assess activities of nucleosides analogues against hepatitis B virus replication. Antivir. Res. 19, 55-70 (1992)).

Virus de hepatitis C

- 15 Se realizaron análisis anti-virus de la hepatitis C (HCV) y una evaluación de la citotoxicidad en un ensayo de 3 días en la línea celular de hepatoblastoma humano que contiene replicón de HCV, AVA5 (Okuse, C., Rinaudo, J.A., Farrar, K., Wells, F. & Korba, B.E. Enhancement of antiviral activity against hepatitis C virus in vitro by interferón combination therapy. Antivir. Res. 65, 23-34 (2005)) como se describe previamente (Blight, K.J., Kolykhalov, A.A. & Rice, CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science 290, 1972-1974 (2000)).

- 20 Resultados de los ensayos contra virus

Tabla 1. Actividad de RM-4803 y RM-4819 contra virus en cultivo celular.

Virus	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)/SI		
	RM4819	RM4803	Cultivo celular
Rotavirus: rotavirus de simio SA-11	0,3/>500	0,06/>2500	MA104
Influenza A: cepa PR8	9,6/>17	2,8/>250	MDCK
Paramixovirus: virus Sendai	1,3/>125	1,1/>125	37RC
Coronavirus: coronavirus canino, cepa S-378	4,9/>33	4,2/13	A72
Rhabdovirus: virus de estomatitis vesicular	1,6/>100	2,8/>50	MA104
Herpes simplex de tipo 1: cepa F1	0,6/>250	5,6/3	HEp-2

- 25 EC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad de ADN o ARN viral (con relación a los niveles medios en cultivos sin tratar). CC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad de MTT reducido con relación a los niveles medios en cultivos sin tratar. SI (índice de selectividad) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>

TABLA 2

Actividad de otros compuestos contra paramixovirus sendai virus en cultivo celular.

Compuesto	Paramixovirus: virus Sendai	
	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI
RM-4820	0,34	35
RM-4821	0,36	>50
RM-4822	0,36	7

- 30 EC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad de ARN viral (con relación a los niveles medios en cultivos no tratados). CC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la

mitad de MTT reducido con relación a los niveles medios en cultivos no tratados. SI (índice de selectividad) =  $CC_{50}/CE_{50}$ .

Tabla 3.

TABLA 3. Actividad de compuestos contra la replicación del HBV en cultivo celular 2.2.15.

Compuesto	ADN de virion extracelular		R.I. de HBV intracelular		Índice de selectividad		
	EC <sub>50</sub> (µM)	EC <sub>90</sub> (µM)	EC <sub>50</sub> (µM)	EC <sub>90</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	Virion	R.I.
Lamivudina	0,058±0,006	0,164±0,015	0,172±0,020	0,660±0,068	2229±76	12959	3377
RM4803	6,3±0,7	15±1,1	12±1,5	50±5,5	>1000 <sup>§</sup>	>67	>20
RM4819	3,5±0,5	9,0±0,8	7,6±0,9	22±2,6	>1000 <sup>§</sup>	>111	>46

5

Los valores presentados (± desviación estándar [S.D.]) se calcularon mediante análisis de regresión lineal usando datos combinados de todos los cultivos tratados. Las S.D. se calcularon usando el error estándar de la regresión generado a partir de análisis de regresión lineal (QuattroPro™). EC<sub>50</sub>, EC<sub>90</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad, o una disminución a la décima parte de ADN de VHB (con relación a los niveles medios en cultivos no tratados), respectivamente. CC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad de la captación de colorante rojo neutro (con relación a los niveles medios en cultivos no tratados). Se usaron los valores de EC<sub>90</sub> para el cálculo de los índices de selectividad [SI] dado que por lo menos se requiere típicamente una disminución a la tercera parte de los niveles de HBV para conseguir significancia estadística en este sistema de ensayo. R.I. de VHB = intermedios de replicación de ADN de HBV intracelular.

15 <sup>§</sup>No se observaron efectos citotóxicos significativos hasta la más alta concentración indicada.

Tabla 4. Actividad de compuestos contra la replicación de virus de hepatitis C en cultivo celular AVA5.

Compuesto	CC <sub>50</sub> (µM)	EC <sub>50</sub> (µM)	EC <sub>90</sub> (µM)	Índice de selectividad
Interferón alfa	>10.000* <sup>§</sup>	2,2±0,2*	8,5±0,6*	>4.545
Ribavirina	61±2,9	94±10	>100 <sup>§</sup>	0,6
RM4803	282±21	37±2,7	98±9,3	7,6
RM4819	164±18	8,9±0,7	79±8,2	18

20 Los valores presentados (± desviación estándar [S.D.]) se calcularon mediante análisis de regresión lineal usando datos combinados de todos los cultivos tratados. Las S.D. se calcularon usando el error estándar de la regresión generado a partir de análisis de regresión lineal (QuattroPro™). EC<sub>50</sub>, EC<sub>90</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad, o una disminución a la décima parte de ARN de HCV (con relación a los niveles medios en cultivos no tratados), respectivamente. CC<sub>50</sub> = concentración de fármaco a la que se observó una disminución a la mitad de la captación de colorante rojo neutro con relación a los niveles medios en cultivos no tratados. Índice de selectividad =  $CC_{50}/EC_{50}$ .

25 \* Los valores para interferón se expresan como "IU/ml".

<sup>§</sup> No se observaron efectos antivirales o citotóxicos significativos hasta la más alta concentración indicada.

### Ejemplo 2: Ensayo contra bacterias anaerobias

30 Métodos. Los aislados anaerobios clínicos recientes (2.000 hasta la fecha) comprendían 40 B. fragilis group, 26 prevotella/porphyromonas, 28 fusobacteria, 16 cocos anaerobios Gram positivos, 14 bacilos anaerobios no formadores de esporas Gram positivos y 18 Clostridia. Se usó metodología MIC de dilución de agar CLSI con agar enriquecido con sangre de Brucella e inóculos de  $1 \times 10^5$  cfu/punto. Las placas se incubaron en una caja de guantes anaerobia a 35°C durante 48 h.

Resultados. Los valores de MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> (µg/ml) eran los siguientes:

Fármaco	B. fragilis gp (40)	Prev/porphy (26)	Fusobacteria (28)	Cocos Gram + (16)	Bacilos Gram + (14)	Clostridia (18)	Todos (142)
Nitazoxanida	2/4	4/8	1/4	0,5/2	16/>32	0,5/4	2/4
Tizoxanida	2/4	2/16	0,5/2	0,5/1	8/>32	0,25/2	2/4
RM 4803	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32
RM 4819	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32
Amoxicilina-ácido clavulánico	1/4	0,06/0,5	0,5/4	0,125/0,5	0,25/1,0	0,125/1,0	0,5/2,0
Clindamicina	2/>32	≤0,015/≤0,015	0,06/0,125	0,125/0,5	0,125/4	1/>32	0,125/8,0
Metronidazol	1/2	0,5/2	0,25/0,25	0,5/1,0	>16/>16	0,25/2	1,0/2,0

Los resultados mostraron que la nitazoxanida, tizoxanida, eran potentes contra todos los grupos de bacterias anaerobias excepto para bacilos anaerobios Gram positivos que incluyen lactobacilos (que son en realidad principalmente microaerófilos). Por el contrario, RM 4803 y RM 4819 no tenían actividad significativa.

### 5 Ejemplo 3 – Actividad antiviral

Los compuestos dentro de la Fórmula (IV) de la presente invención exhiben potente actividad antiviral, como se muestra en la Tabla 5.

Los valores de EC<sub>50</sub> (µg/ml) para 2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4803), 2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-cloro-2-tiazolil)benzamida (RM4804), y 2-(acetoliloxi)-3-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4806), en rinovirus humano de tipo 39 (HRV-39), y virus de influenza H3N2, tipo A, usando un ensayo de inhibición de CPE de ciclo múltiple en monocapas de células OH-I Hela y renales caninas Madin Darby (MDCK), respectivamente, se midieron por métodos microscópicos y espectrofotométricos. Se incluyeron pirodavidir y oseltamivir como controles positivos.

Tabla 5. Actividad de RM-4803, RM-4804 y RM-4806 contra virus en monocapa celular.

Compuesto	Rinovirus humano tipo 39		Virus Influenza A	
	OH-Hela		MDCK	
	2% McCoys + tampón Hepes		% EMBM + Hepes + Tripsina	
	Microscopio		Microscopio	
	Espectrofotómetro		Espectrofotómetro	
R <sub>1</sub> = Br R <sub>4</sub> = metilo R <sub>3</sub> = metilo (RM 4803)	0,06	0,03	0,45	0,18
R <sub>1</sub> = Cl R <sub>4</sub> = metilo R <sub>3</sub> = metilo (RM 4804)	0,57	0,32	0,93	0,57
R <sub>1</sub> = Br R <sub>4</sub> = metilo R <sub>3</sub> = metoxi (RM 4806)	5,0	4,0	0,46	0,57
Pirodavir	0,007	0,004	ND	ND
Oseltamivir	ND	ND	0,13-0,17	0,08-0,36

**Ejemplo 4 – Actividad antiviral selectiva**

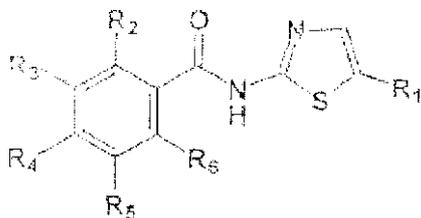
5 Los compuestos anteriormente identificados según la Fórmula (IV) se ensayaron por medios convencionales contra *Trichomys vaginalis*, *Giardia Intestinalis*, y *Trypanosoma brucei*. 2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4803), 2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-cloro-2-tiazolil)benzamida (RM4804), y 2-(acetoliloxi)-3-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4806) cada uno no exhibió actividad antiparasitaria contra *Trichomonas vaginales*, *Giardia intestinalis*, o *Trypanosoma brucei* a concentraciones de por lo menos 50 µg/ml.

10 Por consiguiente, se ha demostrado que según la presente invención, se pueden proporcionar nuevos compuestos como se define en las reivindicaciones que están generalmente caracterizados por la actividad antiviral selectiva.

Como beneficio adicional, se ha descubierto que los anteriores compuestos de benzamida substituidos con halógeno son efectivos contra protozoos intracelulares que incluyen *Cryptosporidium spp.*, *Neospora spp.* y *Sarcocystis neurona* (RM-4820, RM-4821 y RM-4822).

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula (III):



(III)

5 siendo seleccionado el compuesto de fórmula (III) del grupo que consiste en

(i) compuestos de fórmula (III) en la que  $R_1$  es un átomo de halógeno seleccionado de Cl y F,  $R_2$ - $R_6$  son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo de  $C_1$ - $C_4$ , alcoxi de  $C_1$ - $C_4$ , aciloxi, fenilo, bencilo, o  $-C(O)R_7$  en la que  $R_7$  es alquilo de  $C_1$ - $C_4$ , incluyendo sales e hidratos de estos compuestos, en los que por lo menos uno de  $R_2$ - $R_6$  es distinto de hidrógeno y  $R_2$ - $R_6$  incluye no más de un aciloxi y no más de un halógeno,

10 y

(ii) compuestos de fórmula (III) en la que  $R_1$  es Br, y

(a)  $R_2$ - $R_6$  son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo de  $C_1$ - $C_4$ , alcoxi de  $C_1$ - $C_4$ , aciloxi, fenilo, bencilo, o  $-C(O)R_7$  en la que  $R_7$  es alquilo de  $C_1$ - $C_4$ , incluyendo sales e hidratos de estos compuestos, en los que por lo menos uno de  $R_2$ - $R_6$  es un hidroxilo en la posición orto del anillo bencénico y  $R_2$ - $R_6$  incluye no más de un aciloxi y no más de un halógeno,

15

o

(b)  $R_2$  es  $OR_8$  en la que  $R_8$  es  $-C(O)R_{10}$ , en la que  $R_{10}$  es alquilo de  $C_1$ - $C_4$ ,  $R_3$  es alquilo de  $C_1$ - $C_4$  o alcoxi de  $C_1$ - $C_4$ , y  $R_4$ - $R_6$  son hidrógeno, incluyendo sales e hidratos de estos compuestos,

o

(c)  $R_2$ - $R_6$  son independientemente hidrógeno, aciloxi, fenilo, bencilo, o  $-C(O)R_7$  en la que  $R_7$  es alquilo de  $C_1$ - $C_4$ , incluyendo sales e hidratos de estos compuestos, en los que por lo menos dos de  $R_2$ - $R_6$  son distintos de hidrógeno.

20

2. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo (i) y por lo menos uno de  $R_2$ - $R_6$  es hidroxilo.

25

3. Un compuesto como en la reivindicación 2, en el que dicho por lo menos un hidroxilo está en la posición orto.

4. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (ii)c) y dicho aciloxi es acetoxi o propionoxi, y dicho fenilo o bencilo puede estar adicionalmente sustituido.

5. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (ii)c) y  $R_2$ - $R_6$  incluye no más de un aciloxi.

30

6. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (ii)b) y  $R_8$  es  $-C(O)R_{10}$ , en la que  $R_{10}$  es metilo, etilo, propilo o butilo, incluyendo sus isómeros.

7. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (ii)b) y  $R_3$  es metilo o metoxi.

8. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

35

2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4803);

2-(acetoliloxi)-3-metil-N-(5-cloro-2-tiazolil)benzamida (RM4804); y

2-(acetoliloxi)-3-metoxi-N-(5-bromo-2-tiazolil)benzamida (RM4806).

9. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (i) y por lo menos uno de  $R_2$ -

R<sub>6</sub> es distinto de hidrógeno.

10. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (i) y por lo menos dos de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> son distintos de hidrógeno.

5 11. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (i) y por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es hidroxilo, y por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es halógeno, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, aciloxi, fenilo, bencilo, o -C(O)R<sub>7</sub> en la que R<sub>7</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, incluyendo sales e hidratos de estos compuestos; o  
por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es metilo.

12. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (i) y dicho aciloxi es acetoxi o propionoxi, y en el que dicho fenilo o bencilo puede estar adicionalmente substituido.

10 13. Un compuesto como en la reivindicación 1, en el que el compuesto es según (i) y uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es hidroxilo, y por lo menos uno de R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, aciloxi, halógeno, fenilo, bencilo, o -C(O)R<sub>7</sub> en la que R<sub>7</sub> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.