

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 757**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/11** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/EP2013/060704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13727080 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2861611**

54 Título: **Nucleósidos de uracilespirooxetano**

30 Prioridad:

**25.05.2012 EP 12169425**

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

**20.01.2017**

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (100.0%)  
Eastgate Village, Eastgate  
Little Island, County Cork, IE**

72 Inventor/es:

**HOUPI, IOANNIS NICOLAOS;  
JONCKERS, TIM HUGO MARIA;  
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD y  
TAHRI, ABDELLAH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 597 757 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

Nucleósidos de uracilespirooxetano

## Antecedentes de la invención

5 Esta invención se refiere a nucleósidos y nucleótidos de espirooxetano que son inhibidores del virus de la hepatitis C (VHC).

10 El VHC es un virus de ARN de sentido positivo de una sola hebra perteneciente a la familia de virus *Flaviviridae* dentro del género hepacivirus. La región NS5B del polígono de ARN codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que es esencial para la replicación viral. Después de una infección aguda inicial, una mayoría de los individuos infectados desarrolla hepatitis crónica debido a que el VHC se replica preferentemente en hepatocitos pero no es directamente citopático. En particular, la falta de una respuesta vigorosa de linfocitos T y la gran propensión del virus a mutar parecen promover un alto grado de infección crónica. La hepatitis crónica puede avanzar a fibrosis hepática, que conduce a cirrosis, enfermedad hepática terminal y HCC (carcinoma hepatocelular), convirtiéndola en la causa principal de trasplantes de hígado. Hay seis genotipos principales y más de 50 subtipos de VHC, que están distribuidos geográficamente de forma diversa. El genotipo 1 de VHC es el genotipo predominante en Europa y los EE. UU. La amplia heterogeneidad genética del VHC tiene importantes implicaciones diagnósticas y clínicas, que quizá explican las dificultades en el desarrollo de vacunas y la falta de respuesta de la terapia actual.

20 La transmisión de VHC se puede producir a través de contacto con sangre o productos sanguíneos contaminados, por ejemplo después de una transfusión de sangre o del uso de drogas intravenosas. La introducción de pruebas diagnósticas usadas para cribar sangre ha conducido a una tendencia descendente en la incidencia de VHC después de una transfusión. Sin embargo, dado el lento avance hasta la enfermedad hepática terminal, las infecciones existentes continuarán presentando una carga médica y económica grave durante décadas.

25 La terapia actual del VHC se basa en interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (pegilado) en combinación con ribavirina. Esta terapia combinada da una respuesta virológica sostenida en más de 40% de pacientes infectados por VHC de genotipo 1 y aproximadamente 80% de los infectados por los genotipos 2 y 3. Además de la eficacia limitada contra el genotipo 1 de VHC, esta terapia de combinación tiene efectos secundarios significativos y es poco tolerada en muchos pacientes. Efectos secundarios principales incluyen síntomas pseudogripales, anormalidades hematológicas y síntomas neuropsiquiátricos. De ahí que exista una necesidad de tratamientos más eficaces, cómodos y mejor tolerados.

30 Recientemente, las posibilidades terapéuticas se han extendido a la combinación de un inhibidor de proteasa de VHC (p. ej. Telaprevir o boceprevir) e interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (pegilado) / ribavirina.

35 La experiencia con fármacos para VIH, en particular con inhibidores de proteasa de VIH, ha mostrado que la farmacocinética insuficiente y los regímenes de dosificación complejos dan como resultado rápidamente fallos de aceptación terapéutica accidentales. Esto a su vez significa que la concentración valle (concentración plasmática mínima) a las 24 horas para los fármacos respectivos en un régimen para VIH cae frecuentemente por debajo del umbral de IC<sub>90</sub> o ED<sub>90</sub> durante muchas partes del día. Se considera que un nivel valle a las 24 horas de al menos la IC<sub>50</sub>, y de modo más realista, la IC<sub>90</sub> o ED<sub>90</sub>, es esencial para frenar el desarrollo de mutantes que eluden el fármaco. Alcanzar la farmacocinética y el metabolismo farmacológico necesarios para permitir tales niveles valle proporciona un reto riguroso al diseño de fármacos.

40 La NS5B RdRp es esencial para la replicación del genoma de ARN de VHC de sentido positivo de una sola hebra. Esta enzima ha suscitado un interés significativo entre los químicos médicos. Se conocen inhibidores tanto nucleosídicos como no nucleosídicos de NS5B. Los inhibidores nucleosídicos pueden actuar como un terminador de cadena o como un inhibidor competitivo, o como ambos. Para ser activos, los inhibidores nucleosídicos tienen que ser recogidos por la célula y convertidos in vivo en un trifosfato. Esta conversión en el trifosfato esta mediada comúnmente por cinasas celulares, lo que imparte requisitos estructurales adicionales a un inhibidor de polimerasa nucleosídico potencial. Además, esto limita la evaluación directa de nucleósidos como inhibidores de la replicación de VHC a ensayos basados celularmente capaces de fosforilación in situ.

45 Se han hecho varios intentos de desarrollar nucleósidos como inhibidores de RdRp de VHC, pero aunque un puñado de compuestos ha avanzado en el desarrollo clínico, ninguno ha avanzado hasta el registro. Entre los problemas que han encontrado los nucleósidos dirigidos a VHC hasta la fecha están la toxicidad, la mutagenicidad, la falta de selectividad, la escasa eficacia, la escasa biodisponibilidad, regímenes de dosificación insuficientes y la cantidad de tomas y el coste de los artículos elevados consiguientes.

60

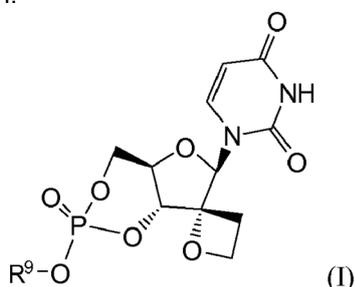
Nucleósidos de espirooxetano, en particular derivados de 1-(8-hidroxi-7-(hidroxi-metil)-1,6-dioxaespiro[3.4]octan-5-il)pirimidin-2,4-diona, y su uso como inhibidores de VHC, son conocidos de los documentos WO2010/130726 y WO2012/062869, incluyendo CAS-1375074-52-4.

5 Existe una necesidad de inhibidores de VHC que puedan vencer al menos una de las desventajas de la terapia actual para VHC tales como efectos secundarios, eficacia limitada, la aparición de resistencia y fallos de cumplimiento terapéutico, o mejorar la respuesta viral sostenida.

10 La presente invención trata de un grupo de derivados de uracilspirooxetano inhibidores de VHC con propiedades útiles relativas a uno o más de los siguientes parámetros: eficacia antiviral hacia al menos uno de los siguientes genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4 y 6, un perfil favorable de desarrollo de resistencia, falta de toxicidad y genotoxicidad, farmacocinética y farmacodinámica favorables y facilidad de formulación y administración.

### Descripción de la invención

15 En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que pueden estar representados mediante la fórmula I:

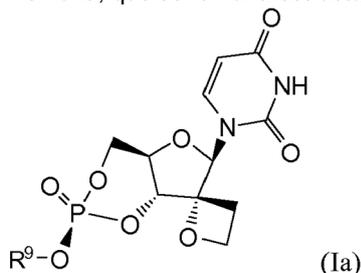


incluyendo cualquier posible estereoisómero de los mismos, en donde:

R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de fenilo, naftilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

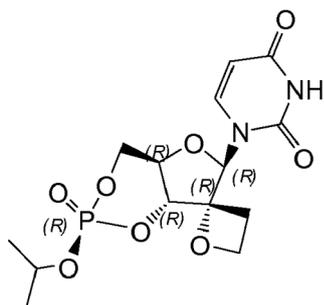
20 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

De particular interés son compuestos de fórmula I o subgrupos de los mismos según se define en la presente memoria, que tienen una estructura según la fórmula Ia:



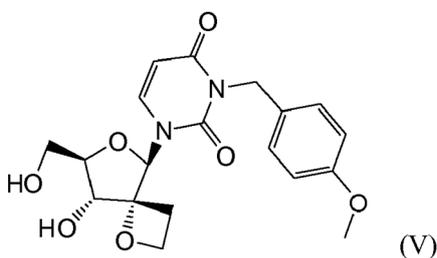
25 En una realización de la presente invención, R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> sustituido con 1 sustituyente seleccionado de fenilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En otra realización de la presente invención, R<sup>9</sup> en la Fórmula I o Ia es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> sustituido con fenil-alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) o cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. En una realización más preferida, R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> y en la más preferida, R<sup>9</sup> es *i*-propilo.

30 Una realización preferida según la invención es un compuesto según la fórmula Ib:



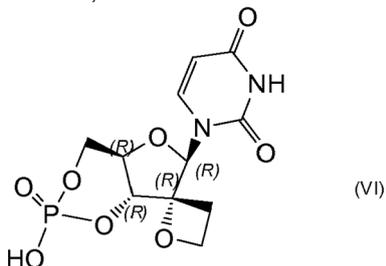
incluyendo cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y el uso del compuesto (V) en la síntesis de un compuesto según la fórmula I, la o Ib.

5 La invención se refiere además a un compuesto de fórmula V:



10 incluyendo cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y el uso del compuesto (V) en la síntesis de un compuesto según la fórmula I, la o Ib.

Además, la invención se refiere a un compuesto de fórmula VI:



15 incluyendo cualquier forma estereoquímica y/o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la fórmula I, la o Ib y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también se refiere a un producto que contiene (a) un compuesto de fórmula I, la o Ib y (b) otro inhibidor de VHC, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones por VHC.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un compuesto según la fórmula I, la o Ib o una composición farmacéutica según la presente invención para el uso como un medicamento, preferiblemente para el uso en la prevención o el tratamiento de una infección por VHC en un mamífero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de fórmula I, la o Ib o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso en el tratamiento o la profilaxis (o la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis) de infección por VHC. Genotipos de VHC representativos en el contexto del tratamiento o la profilaxis según la invención incluyen el genotipo 1b (predominante en Europa) o 1a (predominante en Norteamérica). La invención también proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de infección por VHC, en particular del genotipo 1a o 1b.

De particular interés es el compuesto 8a mencionado en la sección "Ejemplos" así como las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables de este compuesto.

Los compuestos de fórmula I tienen varios centros de quiralidad, en particular en los átomos de carbono 1', 2', 3' y 4'. Aunque la estereoquímica en estos átomos de carbono es fija, los compuestos pueden presentar al menos 75%,

preferiblemente al menos 90%, tal como por encima de 95% o de 98%, de pureza enantiómera en cada uno de los centros quirales.

5 El centro de fósforo puede estar presente como  $R_P$  o  $S_P$ , o una mezcla de tales estereoisómeros, incluyendo racematos. También pueden existir diastereoisómeros resultantes del centro de fósforo quiral y un átomo de carbono quiral.

10 Los compuestos de fórmula I se representan como un estereoisómero definido, excepto para la estereoisomería en el átomo de fósforo. La configuración absoluta de tales compuestos se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, difracción de rayos X o NMR y/o implicación a partir de materiales de partida de estereoquímica conocida. Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenderán preferiblemente formas estereoisómeramente puras del estereoisómero indicado del compuesto de fórmula I particular.

15 Formas estereoisómeras puras de los compuestos y productos intermedios según se menciona en la presente memoria se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantiómeras o diastereoisómeras de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o productos intermedios. En particular, el término "estereoisómeramente puro" trata de compuestos o productos intermedios que tienen un exceso estereoisómero de al menos 80% (es decir mínimo 90% de un isómero y máximo 10% de los otros posibles isómeros) hasta un exceso estereoisómero de 100% (es decir 100% de un isómero y nada de los otros), más en particular, compuestos o  
20 productos intermedios que tienen un exceso estereoisómero de 90% hasta 100%, aún más en particular que tienen un exceso estereoisómero de 94% hasta 100% y lo más en particular que tienen un exceso estereoisómero de 97% hasta 100%, o de 98% hasta 100%. Los términos "enantiómeramente puro" y "diastereoisómeramente puro" se deben entender de un modo similar, pero teniendo en cuenta entonces el exceso enantiómero, y el exceso diastereoisómero, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

25 Formas estereoisómeras puras de los compuestos y productos intermedios de esta invención se pueden obtener mediante la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Pongamos por caso, los enantiómeros se pueden separar entre sí mediante la cristalización selectiva de sus sales diastereoisómeras con ácidos o bases ópticamente activos. Ejemplos de los mismos son ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido ditoluoiltartárico y ácido canforsulfónico. Alternativamente, los enantiómeros se pueden separar mediante técnicas cromatográficas usando  
30 capas estacionarias quirales. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras también se pueden derivar de las correspondientes formas estereoquímicamente isómeras puras de las materias primas apropiadas, con tal de que la reacción se produzca estereoespecíficamente. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetiza mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán  
35 ventajosamente materias primas enantiómeramente puras.

Los racematos diastereoisómeros de los compuestos de fórmula I se pueden obtener separadamente mediante métodos convencionales. Métodos de separación física apropiados que se pueden emplear ventajosamente son, por ejemplo, cristalización selectiva y cromatografía, p. ej. cromatografía en columna.

40 Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las formas salinas por adición de ácido y base atóxicas terapéuticamente activas de los compuestos de fórmula I. Son de interés las formas libres, es decir no salinas, de los compuestos de fórmula I, o de cualquier subgrupo de compuestos de fórmula I especificado en la presente memoria.

45 Las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener convenientemente al tratar la forma de base con tal ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos halohídricos, p. ej. ácidos clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propiónico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir hidroxilbutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares. A la inversa, dichas formar salinas se pueden convertir mediante el tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

50 Los compuestos de fórmula I que contienen un protón ácido también se pueden convertir en sus formas salinas atóxicas por adición de metal o amina mediante el tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Formas salinas básicas apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, p. ej. las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, p. ej. las sales de benzatina, *N*-metil-D-glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

60 El término "solvatos" cubre cualesquiera solvatos farmacéuticamente aceptables que sean capaces de formar los compuestos de fórmula I así como las sales de los mismos. Tales solvatos son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos, p. ej. etanolatos, propanolatos y similares.

65 Algunos de los compuestos de fórmula I también pueden existir en su forma tautómera. Por ejemplo, formas tautómeras de grupos amida ( $-C(=O)-NH-$ ) son iminoalcoholes ( $-C(OH)=N-$ ), que se pueden estabilizar en anillos con

carácter aromático. La base de uridina es un ejemplo de tal forma. Tales formas, aunque no se indican explícitamente en las fórmulas estructurales representadas en la presente memoria, están destinadas a estar incluidas dentro del alcance de la presente invención.

### Breve descripción de la figura

- 5 Figura 1: Eficacia in vivo del compuesto 8a y CAS-1375074-52-4 según se determina en un modelo en ratones de hepatocitos humanizados.

### Definiciones

Según se usa en la presente memoria "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub>" como un grupo o parte de un grupo define radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada saturados que tienen de 1 a n átomos de carbono. Según esto, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>" como un grupo o parte de un grupo define radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada saturados que tienen de 1 a 4 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo. "Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" abarca radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y los homólogos superiores de los mismos que tienen 5 o 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 2-metil-1-butilo, 2-metil-1-pentilo, 2-etil-1-butilo, 3-metil-2-pentilo y similares. De interés entre el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

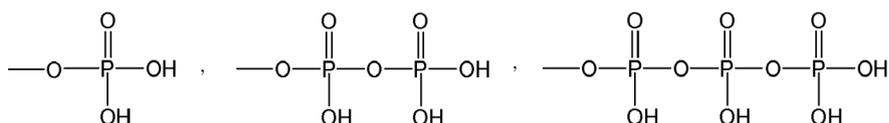
'Alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub>' significa un radical -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub> en el que el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub> es como se define anteriormente. Según esto, 'alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>' significa un radical -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> en el que el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es como se define anteriormente. Ejemplos de alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> son metoxi, etoxi, n-propoxi o isopropoxi. De interés es el 'alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>', que abarca metoxi y etoxi.

"Cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>" incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

En una realización, el término "fenil-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)" es bencilo.

Según se usa en la presente memoria, el término '(=O)' u 'oxo' forma un resto carbonilo cuando está ligado a un átomo de carbono. Se debe apuntar que un átomo sólo puede estar sustituido con un grupo oxo cuando la valencia del átomo lo permita.

El término "éster de monofosfato, difosfato o trifosfato" se refiere a los grupos:



Quando la posición de un radical en un resto molecular no se especifica (por ejemplo, un sustituyente sobre fenilo) o se representa mediante un enlace flotante, tal radical puede estar situado sobre cualquier átomo de tal resto, con la condición de que la estructura resultante sea químicamente estable. Cuando cualquier variable está presente más de una vez en la molécula, cada definición es independiente.

Siempre que se use en la presente memoria, se entiende que el término 'compuestos de fórmula I' o 'los presentes compuestos' o términos similares incluye los compuestos de fórmula I, Ia y Ib, incluyendo las posibles formas estereoquímicamente isómeras, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también incluye compuestos de fórmula I o cualquier subgrupo de fórmula I marcados con isótopo, en donde uno o más de los átomos se reemplaza por un isótopo que difiere del o los encontrados típicamente en la naturaleza. Ejemplos de tales isótopos incluyen isótopos de hidrógeno, tales como <sup>2</sup>H y <sup>3</sup>H; carbono, tales como <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C y <sup>14</sup>C; nitrógeno, tales como <sup>13</sup>N y <sup>15</sup>N; oxígeno, tales como <sup>15</sup>O, <sup>17</sup>O y <sup>18</sup>O; fósforo, tales como <sup>31</sup>P y <sup>32</sup>P; azufre, tales como <sup>35</sup>S; flúor, tales como <sup>18</sup>F; cloro, tales como <sup>36</sup>Cl; bromo, tales como <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br y <sup>82</sup>Br; y yodo, tales como <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I y <sup>131</sup>I. Los compuestos de la invención marcados con isótopo se pueden preparar mediante procedimientos análogos a los descritos en la presente memoria al usar los reactivos o las materias primas marcadas con isótopo apropiados, o mediante técnicas conocidas en la especialidad. La elección del isótopo incluido en un compuesto marcado con isótopo depende de la aplicación específica de ese compuesto. Por ejemplo, para ensayos de distribución tisular, se incorpora un isótopo radiactivo tal como <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C. Para aplicaciones de obtención de imágenes radiológicas, será útil un isótopo emisor de positrones tal como <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>13</sup>N

o <sup>15</sup>O. La incorporación de deuterio puede proporcionar mayor estabilidad metabólica, dando como resultado, p. ej., un incremento de la semivida in vivo del compuesto o una reducción de los requisitos de dosificación.

Procedimientos sintéticos generales

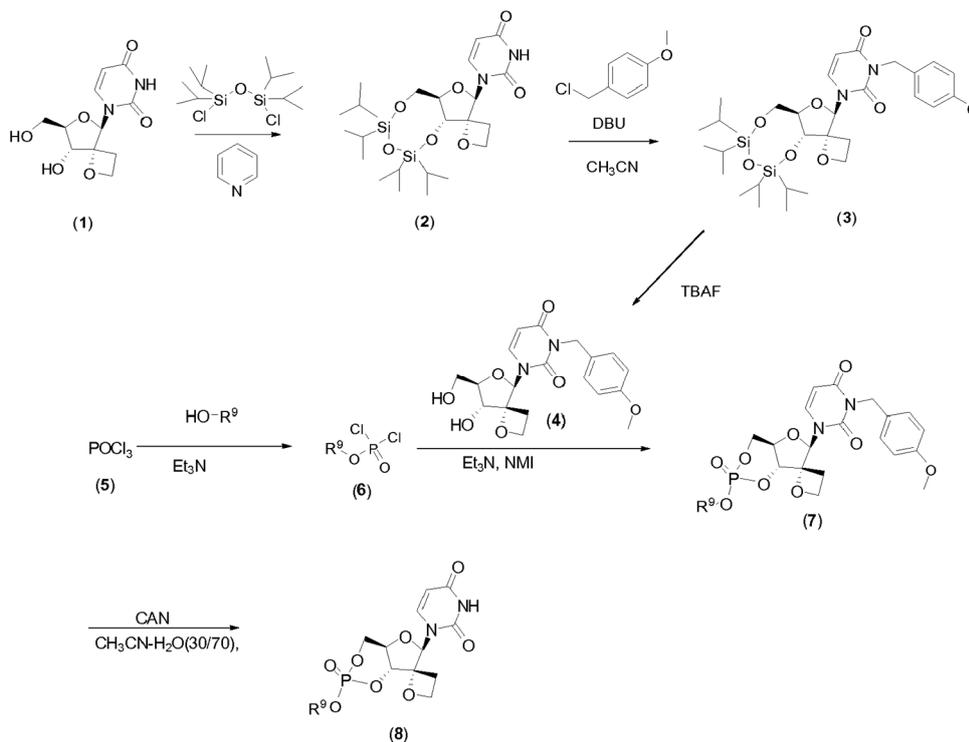
5

Los siguientes esquemas solo pretender ser ilustrativos y no pretender limitar el alcance.

La materia prima 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (1) se puede preparar como se ejemplifica en el documento WO2010/130726. El compuesto (1) se convierte en compuestos de la presente invención a través de un derivado protegido por p-metoxibencilo (4) según se ejemplifica en el siguiente Esquema 1.

10

Esquema 1



15 En el Esquema 1, R<sup>9</sup> puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, naftilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de fenilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxi o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> sustituido con fenilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> o cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, aún más preferiblemente R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> y lo más preferiblemente R<sup>9</sup> es *i*-propilo.

20 En un aspecto adicional, la presente invención trata de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I según se especifica en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener de 1% a 50% o de 10% a 40% de un compuesto de fórmula I y el resto de la composición es dicho vehículo. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente para actuar de un modo profiláctico contra una infección por VHC, para inhibir VHC, para estabilizar o reducir una infección por VHC, en sujetos infectados o sujetos con riesgo de ser infectados. En un aspecto adicional más, esta invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición farmacéutica según se especifica en la presente memoria, que comprende mezclar íntimamente un vehículo farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, según se especifica en la presente memoria.

30

Los compuestos de fórmula I o de cualquier subgrupo de los mismos se pueden formular en diversas formas farmacéuticas con propósitos de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones empleadas habitualmente para administrar fármacos sistémicamente. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma por adición de sal o de complejo metálico, como el ingrediente activo se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la

35

forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma de dosificación unitaria adecuada, particularmente, para administrar oralmente, rectalmente, percutáneamente o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquier medio farmacéutico habitual tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las forma unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar en la solubilidad. Por ejemplo, se pueden preparar soluciones inyectables en las que el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y solución de glucosa. También se pueden preparar soluciones inyectables en las que se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. También se incluyen preparaciones en forma sólida destinadas a convertirse, poco antes de usar, en preparaciones en forma líquida. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no introducen un efecto perjudicial significativo sobre la piel. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar a través de inhalación oral o insuflación en la forma de una solución, una suspensión o un polvo seco usando cualquier sistema de aporte conocido en la especialidad.

Es especialmente ventajoso formular las susodichas composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria para la facilidad de administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria según se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosificación unitarias son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados y revestidos), cápsulas, píldoras, supositorios, paquetes de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables y similares, y los múltiples segregados de los mismos.

Los compuestos de fórmula I muestran actividad contra VHC y se pueden usar en el tratamiento y/o la profilaxis de infección por VHC o enfermedades asociadas con VHC. Las últimas incluyen fibrosis hepática progresiva, inflamación y necrosis que conducen a cirrosis, enfermedad hepática terminal y HCC. Por otra parte, se cree que los compuestos de esta invención son activos contra cepas mutadas de VHC y muestran un perfil farmacocinético favorable y tienen propiedades atractivas en cuanto a la biodisponibilidad, incluyendo semivida, ABC (área bajo la curva) y valores máximos aceptable y careciendo de fenómenos desfavorables tales como comienzo rápido insuficiente y retención tisular.

La actividad antiviral in vitro contra VHC de los compuestos de fórmula I se puede probar en un sistema celular de replicación de VHC basado en Lohmann y cols. (1999) Science 285:110-113, con las modificaciones adicionales descritas por Krieger et al. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624 (incorporados en la presente mediante referencia), que se ejemplifica adicionalmente en la sección de ejemplos. Este modelo, aunque no es un modelo de infección completo para VHC, es ampliamente aceptado como el modelo más robusto y eficaz de replicación autónoma de ARN de VHC disponible actualmente. Se apreciará que es importante distinguir entre compuestos que interfieren específicamente con las funciones de VHC y los que ejercen efectos citotóxicos o citostáticos en el modelo de replicación de VHC, y como consecuencia provocan una disminución en la concentración de ARN de VHC o enzima informadora conectada. Se muestran ensayos en este campo para la evaluación de citotoxicidad celular basados, por ejemplo, en la actividad de enzimas mitocondriales, que usan colorantes fluorogénicos redox tales como resazurina. Por otra parte, existen cribados contadores celulares para la evaluación de la inhibición no selectiva de la actividad del gen informador conectado, tales como luciferasa de luciérnaga. Tipos de células apropiados se pueden equipar mediante transfección estable con un gen informador de luciferasa cuya expresión depende de un promotor génico constitutivamente activo, y tales células se pueden usar como un cribado contador para eliminar inhibidores no selectivos.

Debido a sus propiedades anti-VHC, los compuestos de fórmula I, incluyendo cualesquiera posibles estereoisómeros, las sales por adición o los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles en el tratamiento de animales de sangre caliente, en particular seres humanos, infectados con VHC, y en la profilaxis de infecciones por VHC. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención se pueden usar como un medicamento, en particular como un medicamento anti-VHC o inhibidor de VHC. La presente invención también se refiere al uso de los presentes compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infección por VHC. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para tratar a un animal de sangre caliente, en particular un ser humano, infectado por VHC, o que tiene riesgo de ser infectado por VHC, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz contra VHC de un compuesto de fórmula I, según se especifica en la presente memoria. Dicho uso como un medicamento o método de tratamiento comprende la administración sistémica a sujetos infectados con VHC o a sujetos sensibles a infección con VHC de una cantidad eficaz para combatir las afecciones asociadas con la infección con VHC.

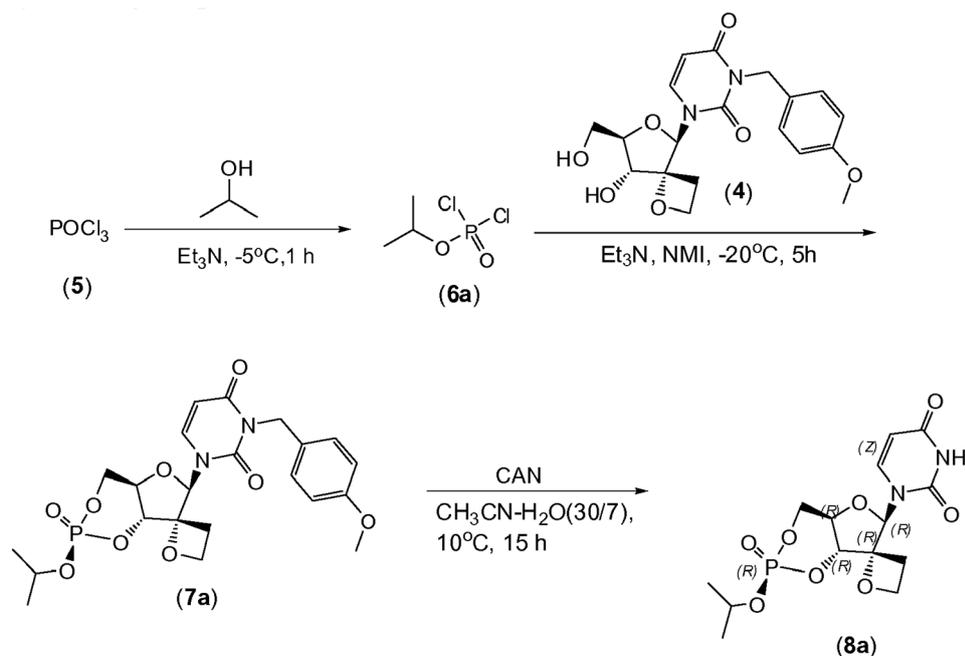
En general, se contempla que una cantidad diaria eficaz antiviral sería de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 mg/kg, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/kg, o de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 mg/kg de peso corporal. Una dosis diaria media se puede obtener al multiplicar estas cantidades diarias por aproximadamente 70. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 2.000 mg, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mg, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 600 mg, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Según se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" tiene el significado conocido por el experto en la especialidad. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" se puede suprimir y se entiende la cantidad exacta. En otras realizaciones, el término "aproximadamente" significa que el valor numérico que sigue al término "aproximadamente" está en el intervalo de  $\pm 15\%$ , o de  $\pm 10\%$ , o de  $\pm 5\%$ , o de  $\pm 1\%$ , de dicho valor numérico.

## Ejemplos

### Esquema 2

#### Síntesis del compuesto (8a)



#### Síntesis del compuesto (2)

El compuesto (2) se puede preparar disolviendo en compuesto (1) en piridina y añadiendo 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano. La reacción se agita a temperatura ambiente hasta la terminación. El disolvente se retira y el producto se redissuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lava con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la retirada del disolvente da el compuesto (2).

#### Síntesis del compuesto (3)

El compuesto (3) se prepara haciendo reaccionar el compuesto (2) con cloruro de p-metoxibencilo en presencia de DBU como la base en CH<sub>3</sub>CN.

#### Síntesis del compuesto (4)

El compuesto (4) se prepara mediante escisión del grupo protector bis-sililo en el compuesto (3) usando TBAF como la fuente de fluoruro.

## Síntesis del compuesto (6a)

Una solución de alcohol isopropílico (3,86 ml, 0,05 mol) y trietilamina (6,983 ml, 0,05 mol) en diclorometano (50 ml) se añadió a una solución agitada de  $\text{POCl}_3$  (5) (5,0 ml, 0,0551 mol) en DCM (50 ml) gota a gota a lo largo de un período de 25 min. a  $-5^\circ\text{C}$ . Después de que la mezcla se agitara durante 1 h, el disolvente se evaporó, y el residuo se suspendió en éter (100 ml). La sal de hidrocloreto de trietilamina se filtró y se lavó con éter (20 ml). El filtrado se concentró y el residuo se destiló para dar el (6) como un líquido incoloro (6,1 g, 69% de rendimiento).

## Síntesis del compuesto (7a)

Se añadió trietilamina (2,07 g, 20,46 mmol) a temperatura ambiente a una suspensión agitada de (4) (2,0 g, 5,13 mmol) en diclorometano (50 ml). La mezcla de reacción se enfrió hasta  $-20^\circ\text{C}$  y a continuación se añadió (6a) (1,2 g, 6,78 mmol) gota a gota a lo largo de un período de 10 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 15 min. y a continuación se añadió NMI (0,84 g, 10,23 mmol), gota a gota a lo largo de un período de 15 min. La mezcla se agitó a  $-15^\circ\text{C}$  durante 1 h y a continuación se calentó lentamente hasta temperatura ambiente en 20 h. El disolvente se evaporó, la mezcla se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna usando éter de petróleo/EtOAc (10:1 hasta 5:1 como un gradiente) para dar (7a) como un sólido blanco (0,8 g, 32% de rendimiento).

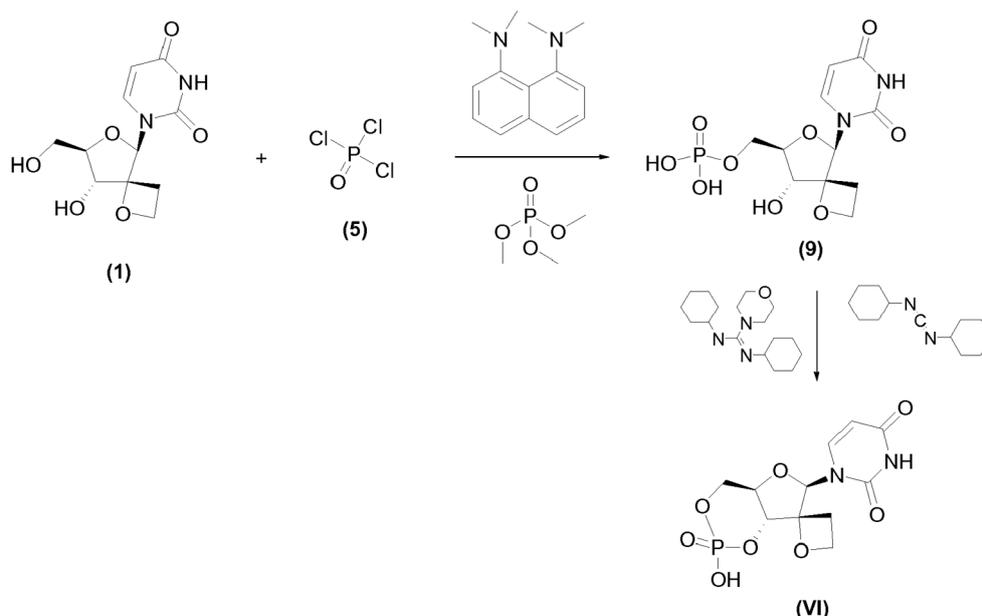
## 15 Síntesis del compuesto (8a)

Se añadió CAN en porciones por debajo de  $20^\circ\text{C}$  a una solución de (7a) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (30 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (7 ml). La mezcla se agitó a  $15\text{-}20^\circ\text{C}$  durante 5 h bajo  $\text{N}_2$ . Se añadió gota a gota  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (370 ml) a la mezcla de reacción por debajo de  $15^\circ\text{C}$ , y a continuación se añadió  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (370 ml). La mezcla se filtró y el filtrado se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml \*3). La capa orgánica se secó y se concentró para dar el residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para dar el compuesto (8a) buscado como un sólido blanco. (Rendimiento: 55%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CLOROFORMO)  $\delta$  ppm 1,45 (dd,  $J=7,53, 6,27$  Hz, 6 H), 2,65-2,84 (m, 2 H), 3,98 (td,  $J=10,29, 4,77$  Hz, 1 H), 4,27 (t,  $J=9,66$  Hz, 1 H), 4,43 (ddd,  $J=8,91, 5,77, 5,65$  Hz, 1 H), 4,49 - 4,61 (m, 1 H), 4,65 (td,  $J=7,78, 5,77$  Hz, 1 H), 4,73 (d,  $J=7,78$  Hz, 1 H), 4,87 (dq,  $J=12,74, 6,30$  Hz, 1 H), 5,55 (s. an., 1 H), 5,82 (d,  $J=8,03$  Hz, 1 H), 7,20 (d,  $J=8,03$  Hz, 1 H), 8,78 (s. an., 1 H);  $^{31}\text{P}$  NMR (CLOROFORMO- $d$ )  $\delta$  ppm -7,13; LC-MS: 375 (M+1)+.

## 25 Esquema 3

## Síntesis del compuesto (VI)



## Etapa 1: Síntesis del compuesto (9)

El compuesto (1), CAS 1255860-33-3 (1.200 mg, 4,33 mmol) y 1,8-bis(dimetil-amino)naftaleno (3.707 mg, 17,3 mmol) se disolvieron en 24,3 ml de fosfato de trimetilo. La solución se enfrió hasta 0°C. Se añadió el Compuesto (5) (1,21 ml, 12,98 mmol) y la mezcla se agitó bien manteniendo la temperatura a 0°C durante 5 horas. La reacción se desactivó mediante la adición de 120 ml de solución de bromuro de tetraetilamonio (1 M) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x80 ml). La purificación se realizó mediante HPLC preparativa (Fase estacionaria: RP XBridge Prep C18 OBD-10 µm, 30x150 mm, fase móvil: solución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> al 0,25% en agua, CH<sub>3</sub>CN), dando dos fracciones. La fracción más pura se disolvió en agua (15 ml) y se hizo pasar a través de una columna Dowex (H<sup>+</sup>) rellena manualmente, mediante elución con agua. El final de la elución se determinó comprobando la absorbancia UV de las fracciones que se eluían. Las fracciones combinadas se congelaron a -78°C y se liofilizaron. El compuesto (9) se obtuvo como un sólido apelmusado blanco (303 mg, (0,86 mmol, 20% de rendimiento)), que se usó inmediatamente en la siguiente reacción.

## Etapa 2: Preparación del compuesto (VI)

El compuesto (9) (303 mg, 0,86 mmol) se disolvió en 8 ml de agua y se añadió a esta solución N,N'-d ciclohexil-4-morfolinocarboxamida (253,8 mg, 0,86 mmol) disuelta en piridina (8,4 ml). La mezcla se mantuvo durante 5 minutos y a continuación se evaporó hasta sequedad, se secó durante la noche a vacío a 37°C. El residuo se disolvió en piridina (80 ml). Esta solución se añadió gota a gota a DCC (892,6 mg, 4,326 mmol) vigorosamente agitada en piridina (80 ml) a temperatura de reflujo. La solución se mantuvo a reflujo a lo largo de 1,5 h durante las cuales se observaba algo de turbidez en la solución. La mezcla de reacción se enfrió y se evaporó hasta sequedad. Se añadieron éter dietílico (50 ml) y agua (50 ml) al residuo sólido. Se separó por filtración N,N'-d ciclohexilurea y la fracción acuosa se purificó mediante HPLC preparativa (Fase estacionaria: RP XBridge Prep C18 OBD-10 µm, 30x150 mm, fase móvil: solución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> al 0,25% en agua, CH<sub>3</sub>CN), dando un sólido blanco que se secó durante la noche a vacío a 38°C. (185 mg, 0,56 mmol, 65% de rendimiento). LC-MS: (M+H)<sup>+</sup>: 333. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,44 - 2,59 (m, 2 H) la señal cae por debajo de la señal del DMSO, 3,51 (td, J=9,90, 5,50 Hz, 1 H), 3,95 - 4,11 (m, 2 H), 4,16 (d, J=10,34 Hz, 1 H), 4,25 - 4,40 (m, 2 H), 5,65 (d, J=8,14 Hz, 1 H), 5,93 (s. an., 1 H), 7,46 (d, J=7,92 Hz, 1 H), 2H no observados

## Ejemplos biológicos

## Ensayos de replicón

Los compuestos de fórmula I se examinaron con respecto a la actividad en la inhibición de la replicación de ARN de VHC en un ensayo celular. El ensayo se usó para demostrar que los compuestos de fórmula I inhibían una línea celular de replicación celular funcional de VHC, también conocida como replicones de VHC. El ensayo celular se basaba en una construcción de expresión bicistrónica, según se describe por Lohmann y cols. (1999) Science vol. 285 pp. 110-113 con modificaciones descritas por Krieger y cols. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, en una estrategia de cribado de múltiples objetivos.

## Ensayo de replicón (A)

En esencia, el método era como sigue. El ensayo utilizaba la línea celular Huh-7 luc/neo (posteriormente en la presente memoria denominada Huh-Luc) establemente transfectada. Esta línea celular aloja un ARN que codifica una construcción de expresión bicistrónica que comprende las regiones NS3-NS5B silvestres de VHC tipo 1b traducidas de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), precedidas por una porción informadora (F<sub>1</sub>L-luciferasa) y una porción de marcador seleccionable (neo<sup>R</sup>, neomicina fosfotransferasa). La construcción está limitada por NTR (regiones no traducidas) 5' y 3' procedentes del genotipo 1b de VHC. El cultivo continuado de las células con replicón en presencia de G418 (neo<sup>R</sup>) depende de la replicación del ARN de VHC. Las células con replicón establemente transfectadas que expresan ARN de VHC, que se replica autónomamente y hasta niveles elevados, que codifican entre otras cosas luciferasa, se usaron para cribar los compuestos antivirales.

Las células con replicón se sembraron en placas de 384 pocillos en presencia de los compuestos de prueba y control que se añadieron en diversas concentraciones. Después de una incubación de tres días, la replicación de VHC se midió ensayando la actividad de luciferasa (usando sustratos y reactivos de ensayo de luciferasa estándar y un aparato de obtención de imágenes de microplacas Perkin Elmer ViewLux™ ultraHTS). Las células con replicón en los cultivos de control tienen una elevada expresión de luciferasa en ausencia de inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto sobre la actividad de luciferasa se verificó en las células Huh-Luc, permitiendo una curva de respuesta a la dosis para cada compuesto de prueba. A continuación, se calcularon los valores de EC<sub>50</sub>, valor que representa la cantidad del compuesto requerida para disminuir el nivel de actividad de luciferasa detectada en 50%, o, más específicamente, la capacidad para replicarse del ARN del replicón de VHC conectado genéticamente.

Resultados (A)

La Tabla 1 muestra los resultados del replicón (EC<sub>50</sub>, replicón) y los resultados de citotoxicidad (CC<sub>50</sub> (µM) (Huh-7)) obtenidos para el compuesto de los ejemplos dados anteriormente.

5 Tabla 1.

Compuesto número	EC <sub>50</sub> (µM) (VHC)	CC <sub>50</sub> (µM) (Huh-7)
8a	0,13 (n = 4)	> 100

Ensayo de replicón (B)

Se realizaron ensayos de replicón adicionales con el compuesto 8a de los que se analizan posteriormente los protocolos y resultados.

10 Ensayo 1

15 La actividad anti-VHC del compuesto 8a se probó en cultivo celular con células con replicón generadas usando reactivos del laboratorio Bartenschlager (el clon ET del replicón del informador de luciferasa subgenómico bicistrónico de VHC 1b). El protocolo incluía una incubación de 3 días de 2.500 células con replicón en un formato de 384 pocillos en una serie de dilución 1:4 de nueve puntos del compuesto. Se generaron curvas de respuesta a la dosis basándose en la lectura de luciferasa de luciérnaga. En una variación de este ensayo, una incubación de 3 días de 3.000 células en un formato de 96 pocillos en una serie de dilución de nueve puntos se siguió mediante detección con qRT-PCR Taqman del genoma de VHC, y se normalizó para el transcrito celular, RPL13 (del gen de la subunidad RPL13 ribosómica) como un control para la inhibición de la transcripción celular por el compuesto.

Ensayo 2

20 La actividad anti-VHC del compuesto 8a se probó en cultivo celular con células con replicón generadas usando reactivos del laboratorio Bartenschlager (el clon ET del replicón del informador de luciferasa subgenómico bicistrónico de VHC 1b o Huh-Luc-Neo). El protocolo incluía una incubación de 3 días de  $2 \times 10^4$  células con replicón en un formato de 96 pocillos en una serie de dilución 1:5 de seis puntos del compuesto. Se generaron curvas de respuesta a la dosis basadas en la lectura de luciferasa.

25

Ensayo 3

30 La actividad anti-VHC del compuesto 8a se probó en cultivo celular con células con replicón generadas usando reactivos del laboratorio Bartenschlager (el clon ET del replicón del informador de luciferasa subgenómico bicistrónico de VHC 1b o Huh-Luc-Neo). El protocolo incluía una incubación de 3 días bien de  $8 \times 10^3$  células o bien  $2 \times 10^4$  células en un formato de 96 pocillos en una serie de dilución 1:5 de ocho puntos del compuesto. Se generaron curvas de respuesta a la dosis basadas en la lectura de luciferasa.

35 Resultados

La Tabla 2 muestra los resultados promedio del replicón (EC<sub>50</sub>, replicón) obtenido para el compuesto 8a después de ensayos como los dados anteriormente.

Tabla 2:

Ensayo	Valor de EC <sub>50</sub> promedio (8a):
1	57 µM (n = 8)
2	17,5 µM (n=4)
3	> 100 µM (n =1)

40

Ensayo in vitro de hepatocitos humanos primarios

45 La actividad anti-VHC del compuesto 8a se determinó en un ensayo in vitro de hepatocitos humanos primarios. Los protocolos y los resultados se analizan posteriormente.

## Protocolo

## Aislamiento y cultivo de hepatocitos

Se prepararon hepatocitos humanos primarios (HHP) a partir de pacientes que sufrían hepactetomía parcial para metástasis o tumores benignos. Hepatocitos humanos recientes se aislaron de fragmentos de hígado encapsulados usando una modificación del método de digestión con colagenasa en dos etapas. En resumen, tejido hepático encapsulado se puso en un aparato de perfusión hecho a medida y los vasos hepáticos se canularon con un colector de múltiples canales conectados por tubo. El fragmento de hígado se perfundió inicialmente durante 20 min. con un tampón libre de calcio, precalentado (37°C), complementado con ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) seguido por perfusión con un tampón precalentado (37°C) que contiene calcio (CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 0,05% de colagenasa durante 10 min. A continuación, el fragmento de hígado se removió suavemente para liberar células hepáticas en medio de lavado de hepatocitos. La suspensión celular se filtró a través de un embudo revestido con gasa. Las células se centrifugaron a baja velocidad de centrifugación. El sobrenadante, que contenía hepatocitos dañados o muertos, células no parenquimales y residuo se retiró y los hepatocitos aglomerados se resuspendieron en medio de lavado de hepatocitos. La viabilidad y la concentración celular se determinaron mediante la prueba de exclusión con azul tripán.

Las células se resuspendieron en medio completo para hepatocitos que consistía en medio de William (Invitrogen) complementado con 100 UI/l de insulina (Novo Nordisk, Francia) y 10% de suero de ternero fetal termoinactivado (Biowest, Francia) y se sembraron a una densidad de 1,8x10<sup>6</sup> células viables en placas de 6 pocillos que se habían revestido previamente con un colágeno tipo I de piel de ternero (Sigma-Aldrich, Francia). El medio se reemplazó 16-20 horas más tarde por medio completo para hepatocitos reciente complementado con hemisuccinato de hidrocortisona (SERB, París, Francia) y las células se dejaron en este medio hasta la inoculación de VHC. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% humidificada.

Los HHP se inocularon 3 días después de la siembra. Se usaron soluciones madre de JFH1-VHCcc para inocular HHP durante 12 horas, a una multiplicidad de infección (MDI) de 0,1 ffu por célula. Después de una incubación de 12 horas a 37°C, el inóculo se retiró y las monocapas se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron en medio completo para hepatocitos que contenía 0,1% de dimetilsulfóxido como control de vehículo, 100 UI/ml de IFN $\alpha$  como control negativo o también concentraciones crecientes de compuesto 8a. A continuación, los cultivos se mantuvieron durante 3 días.

## Cuantificación de ARN de VHC

Se preparó ARN total a partir de células cultivadas o de sobrenadantes de cultivo filtrados usando el miniestuche para ARN viral RNeasy o Qiamp, respectivamente (Qiagen SA, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del fabricante. El ARN de VHC se cuantificó en células y sobrenadantes de cultivo usando una técnica de PCR en tiempo real específica para la hebra descrita previamente (Carrière M y cols. 2007):

La transcripción inversa se realizó usando cebadores descritos previamente situados en la región 50 NCR del genoma de VHC, tag-RC1 (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAAGTCTAGCCATGGCGTTAGTA-3') y RC21 (5'-CTCCCGGGGCACTCGCAAGC-3') para las hebras negativa y positiva, respectivamente. Después de una etapa de desnaturalización realizada a 70°C durante 8 min., la plantilla de ARN se incubó a 4°C durante 5 min. en presencia de 200 ng de cebador tag-RC1 y 1,25 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido (dNTP) (Promega, Charbonnières, Francia) en un volumen total de 12  $\mu$ l.

La transcripción inversa se llevó a cabo durante 60 min. a 60°C en presencia de 20 U de RNaseOut<sup>TM</sup> (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) y 7,5 U de transcriptasa inversa Thermoscript<sup>TM</sup> (Invitrogen), en el tampón recomendado por el fabricante. Se aplicó un tratamiento adicional añadiendo 1  $\mu$ l (2U) de RNaseH (Invitrogen) durante 20 min. a 37°C.

La primera ronda de PCR con cebadores internos se realizó con 2  $\mu$ l del ADNc obtenido en un volumen total de 50  $\mu$ l, que contenía 3 U de polimerasa de Taq (Promega), 0,5 mM de dNTP y 0,5  $\mu$ M de cebadores RC1 (5'-GTCTAGCCATGGCGTTAGTA-3') y RC21 para la amplificación de la hebra positiva, o cebadores de Tag (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAA-3') y RC21 para la amplificación de la hebra negativa. El control de PCR consistía en 18 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 min.), renaturalización (55°C durante 45 s) y extensión (72°C durante 2 min.). El ADNc obtenido se purificó usando el estuche de Qiagen, según las instrucciones del fabricante.

A continuación, el producto purificado se sometió a PCR en tiempo real. La reacción se llevó a cabo usando el estuche LightCycler 480 SYBR Green I Master (2x con) (Roche, Grenoble, Francia), con instrumentos y tecnología LC480 (Roche Diagnostics). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen total de 10  $\mu$ l, que contenía 5  $\mu$ l de Sybrgreen I Master Mix (2x) y 25 ng de los cebadores 197R (5'-CTTTCGCGACCCAACACTAG-3') y 104 (5'-AGAGCCATAGTGGTCTGCGG-3'). El protocolo de PCR consistía en una etapa de desnaturalización inicial durante

10 min. a 94°C, seguida por 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 s), renaturalización (57°C durante 5 s) y extensión (72°C durante 8 s).

5 La cuantificación de ARN de 28Sr mediante RT-PCR específica se usó como un estándar interno para expresar los resultados de hebras positivas o negativas de VHC por µg de ARN de hepatocitos total. Se diseñaron cebadores específicos para ARNr de 28 S usando el software Oligo6 5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'(nt2717-2735) y 50-ACATTGTTCCAACATGCCAG-30 (nt 2816-2797). La transcripción inversa se realizó usando transcriptasa inversa de AMV (Promega) y el protocolo de PCR consistía en una etapa de desnaturalización inicial durante 8 min. a 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 s), renaturalización (54°C durante 5 s) y extensión (72°C durante 5 s).

#### Resultado

15 La Tabla 3 muestra la actividad anti-VHC del compuesto 8a según se determina en el ensayo in vitro de hepatocitos humanos primarios descrito anteriormente. Los números se expresan como 10<sup>6</sup> copias de ARN de VHC/µg de ARN total. Se dan resultados de dos experimentos independientes (Exp 1 y Exp 2). Los datos por experimento son el promedio de dos medidas.

Tabla 3: Efecto del compuesto 8a sobre niveles de ARN de VHC de hebra positiva en hepatocitos humanos primarios (expresado como 10<sup>6</sup> copias de ARN de VHC/µg de ARN total).

20 Tabla 3.

	Exp. 1	Exp. 2
Sin VHC	0	0
Control de VHC	3,56	5,53
IFNα (100 IU/ml)	1,48	1,59
8a (0,195 µM)	2,18	1,12
8a (0,78 µM)	2,25	1,3
8a (3,12 µM)	1,09	0,94
8a (12,5 µM)	2,17	1,3
8a (50 µM)	0,94	1,33

#### Ensayo de eficacia in vivo

25 La eficacia in vivo del compuesto 8a y CAS-1375074-52-4 se determinó en un modelo en ratones de hepatocitos humanizados (ratón PBX) según se describe previamente en Inoue y cols. (Hepatology. 2007 Apr; 45(4):921-8) y Tenato y cols. (Am J Pathol 2004;165-901-912) con la siguiente especificación: Animales de prueba: ratones PXB infectados con VHC G1a, machos o hembras, >70% de índice de sustitución de hepatocitos humanos. La dosificación se realizó por vía oral durante 7 días a las dosis indicadas posteriormente, en donde QD representa una sola dosis al día, BID representa dos dosis al día.

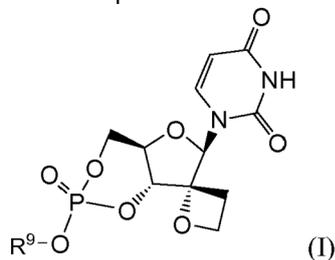
30 La eficacia del compuesto 8a se comparó con CAS-1375074-52-4. Los resultados se indican en la Figura 1. La Figura muestra el log de la caída de ARN viral de VHC después de la dosificación durante un período de 7 días.

35 La Figura 1 muestra claramente que una dosificación de 100 mg/kg QD para CAS 1375074-52-4 (indicado como \*, n=4) no da como resultado un log de caída significativo en el ARN viral de VHC. Esto está en gran contraste con cada uno de los regímenes de dosis indicados para el compuesto 8a, donde se observa un log de caída claro para 100 mg/kg QD (indicado como ◆, n=3), 200 mg/kg QD (indicado como ●, n=4), 50 mg/kg BID (indicado como ■, n=4). El efecto de log de caída más pronunciado en el ARN viral se observa después de una dosificación de 7 días de compuesto 8a a 100 mg/kg BID (indicado como ▲, n=4).

40

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:

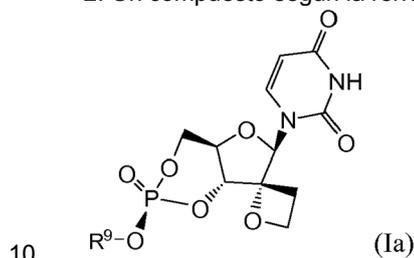


incluyendo cualquier posible estereoisómero del mismo, en el que:

5  $R^9$  es alquilo  $C_1-C_6$ , fenilo, cicloalquilo  $C_3-C_7$  o alquilo  $C_1-C_3$  sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de fenilo, naftilo, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , hidroxilo o alcoxi  $C_1-C_6$ ;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, que es de fórmula Ia:

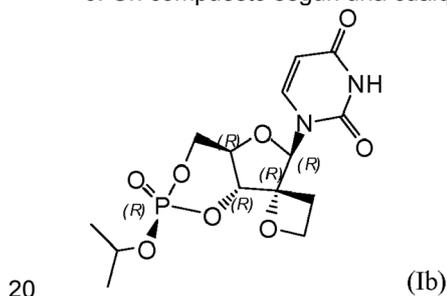


3. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que  $R^9$  es alquilo  $C_1-C_6$  o alquilo  $C_1-C_2$  sustituido con fenilo, alcoxi  $C_1-C_2$  o cicloalquilo  $C_3-C_6$ .

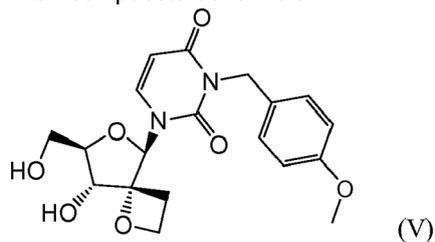
15 4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que  $R^9$  es alquilo  $C_2-C_4$ .

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que  $R^9$  es *i*-propilo.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es de fórmula Ib:



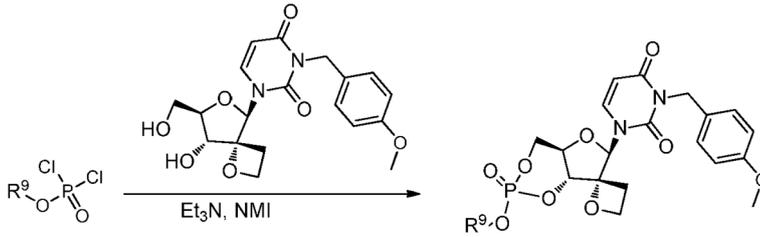
7. Un compuesto de fórmula V:



25 incluyendo una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

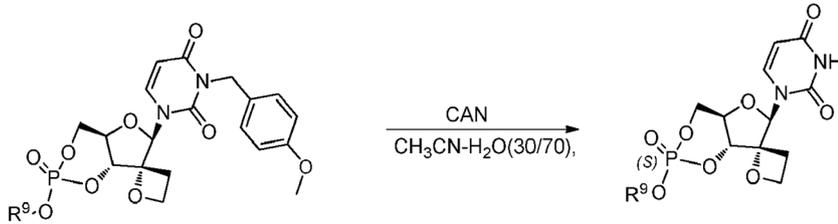
8. El uso del compuesto (V) en la síntesis de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, según las 2 etapas siguientes:

5 etapa 1



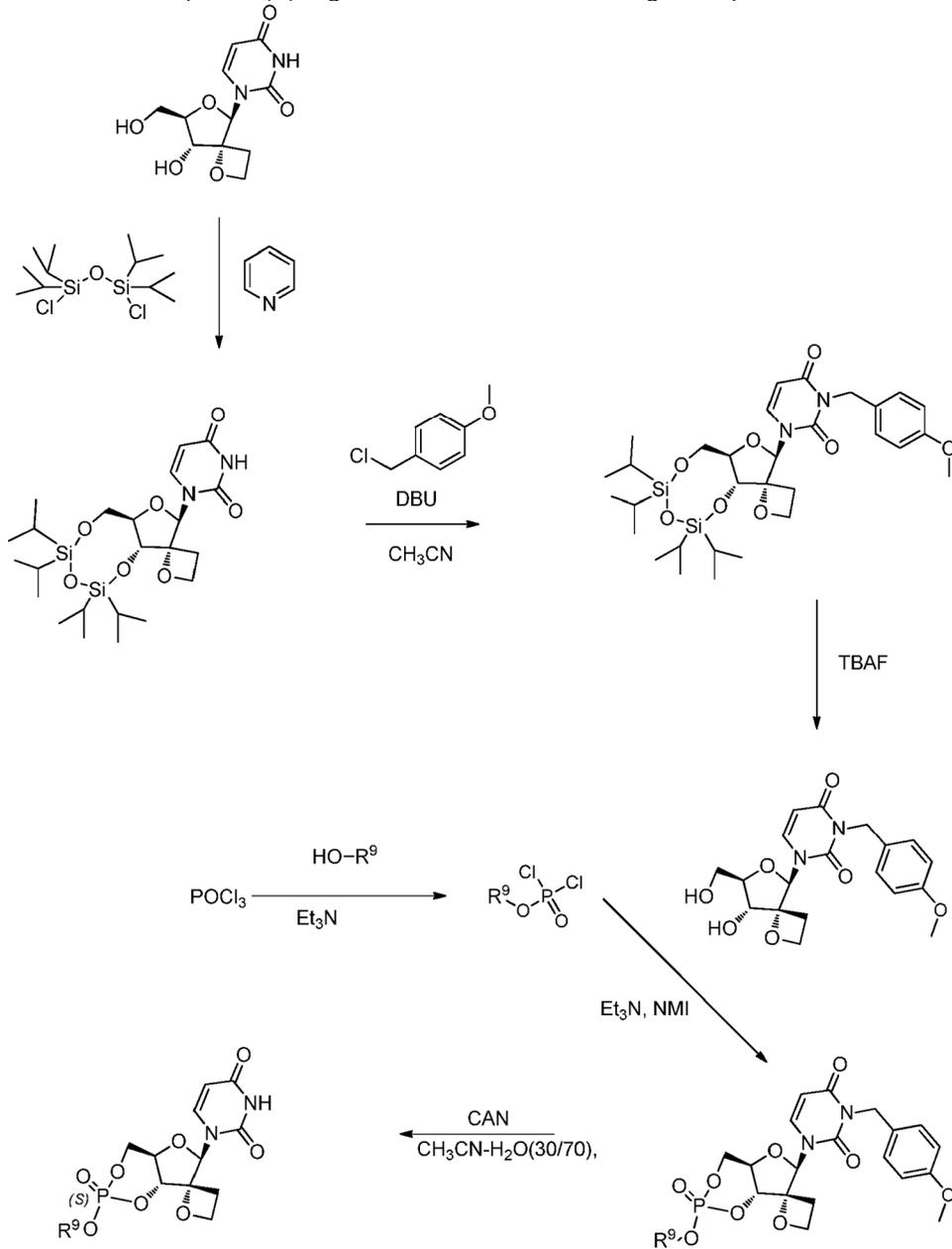
10

etapa 2

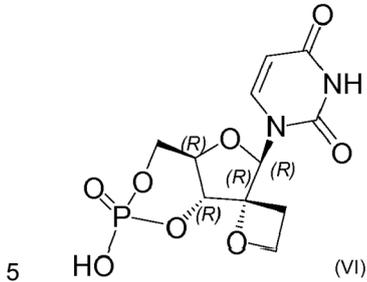


15

20 9. El uso del compuesto (V) según la reivindicación 8 en el siguiente procedimiento:



10. Un compuesto de fórmula VI:



incluyendo cualquier forma estereoquímica y/o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la reivindicación 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 11, para el uso como un medicamento.
- 15 13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la reivindicación 10, o una composición farmacéutica según la reivindicación 11, para el uso en la prevención o el tratamiento de una infección por VHC en un mamífero.
- 20 14. Un producto que contiene (a) un compuesto de fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la reivindicación 10, y (b) otro inhibidor de VHC, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones por VHC.

Figura 1

