

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 269**

51 Int. Cl.:

A61K 31/155	(2006.01) A61K 31/7068	(2006.01)
A61K 31/167	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/18	(2006.01) A61K 31/7056	(2006.01)
A61K 31/341	(2006.01) A61K 38/21	(2006.01)
A61K 31/36	(2006.01) A61P 1/16	(2006.01)
A61K 31/381	(2006.01) A61P 31/12	(2006.01)
A61K 31/415	(2006.01)	
A61K 31/435	(2006.01)	
A61P 31/14	(2006.01)	
A61K 31/7064	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2008** **E 13178966 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2659885**

54 Título: **Procedimientos y composiciones antivíricas frente a la hepatitis C**

30 Prioridad:

03.08.2007 AU 2007904154 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EWART, GARY DINNEEN;
LUSCOMBE, CAROLYN ANNE y
MILLER, MICHELLE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 614 269 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).

DESCRIPTION

Procedimientos y composiciones antivíricas frente a la hepatitis C

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones novedosas que tienen actividad frente al virus de la hepatitis C (VHC).

- 5 La invención también se refiere a procedimientos para retrasar, reducir o de otro modo inhibir el crecimiento del VHC y/o la actividad funcional.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 De ningún modo se debe considerar que ningún análisis de la técnica anterior en toda la memoria descriptiva sea una admisión de que dicha técnica anterior sea ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

- 15 En la actualidad, existe una gran necesidad del desarrollo de nuevos tratamientos que sean eficaces frente a las infecciones víricas, particularmente frente a las infecciones víricas que se asocian con una alta morbilidad y mortalidad, y que tienen un impacto sobre las poblaciones de tamaño considerable, por ejemplo, el virus de la hepatitis C (VHC). Los tratamientos que actualmente están disponibles son inadecuados o ineficaces en grandes proporciones de pacientes infectados con el VHC.

- 20 La hepatitis C es una enfermedad vírica infecciosa de transmisión hemática que está provocada por un virus hepatotrópico llamado VHC. La infección puede provocar inflamación del hígado, que a menudo es asintomática, pero más adelante la hepatitis crónica subsiguiente puede dar como resultado cirrosis (cicatrización fibrótica del hígado) y cáncer de hígado. El VHC es uno de los seis virus de la hepatitis conocidos: A, B, C, D, E, G y se transmite por contacto de sangre con sangre con la sangre de una persona infectada. Los síntomas se pueden tratar médicamente, y se puede eliminar el virus de una proporción de pacientes mediante un largo tratamiento de medicamentos antivíricos. Aunque la intervención médica temprana es muy útil, las personas con infección por VHC a menudo experimentan síntomas leves, y, por consiguiente, no reciben tratamiento. Se estima que 150-200 millones de personas en todo el mundo están infectadas con VHC. Aquellos con antecedentes de uso de drogas intravenosas, uso de drogas inhaladas, tatuajes, o
- 25 que han estado expuestos a la sangre por medio de relaciones sexuales de riesgo tienen un riesgo incrementado de contraer esta enfermedad. La hepatitis C es la causa principal del trasplante de hígado en los Estados Unidos.

- 30 La hepatitis C se presenta como dos etapas clínicas distintas. En primer lugar, la hepatitis C se presenta como hepatitis C aguda, que se refiere a los primeros 6 meses después de la infección con VHC. Entre un 60% a un 70% de las personas infectadas no desarrollan ningún síntoma durante la fase aguda. En la minoría de pacientes que experimentan síntomas de fase aguda, generalmente son leves y no específicos, y rara vez dan lugar a un diagnóstico específico de la hepatitis C. Los síntomas de la infección por hepatitis C aguda incluyen disminución del apetito, fatiga, dolor abdominal, ictericia, prurito y síntomas similares a la gripe.

- 35 Normalmente el VHC se puede detectar en la sangre en una a tres semanas después de la infección, y los anticuerpos para el virus generalmente se pueden detectar en 3 a 12 semanas. Aproximadamente un 20-30 % de las personas infectadas con VHC eliminan el virus de sus cuerpos durante la fase aguda, como se muestra mediante la normalización en las pruebas de la función hepática (PFH), tales como la normalización de alanina-transaminasa (ALT) y aspartato-transaminasa (AST), así como el aclaramiento de ARN de VHC en plasma (esto se conoce como aclaramiento vírico espontáneo). El 70-80 % restante de los pacientes infectados con VHC desarrollan hepatitis C crónica.

- 40 La hepatitis C crónica se define como una infección con VHC que persiste durante más de seis meses. Clínicamente, a menudo es asintomática (sin ictericia) y se descubre principalmente de manera accidental.

- 45 La evolución natural de la hepatitis C crónica varía considerablemente de persona a persona. Virtualmente todas las personas infectadas con VHC tienen evidencia de inflamación en una biopsia hepática. Sin embargo, la tasa de evolución de la cicatrización del hígado (fibrosis) muestra una variabilidad significativa entre las personas. Los datos recientes indican que en los pacientes no tratados, aproximadamente un tercio evoluciona a cirrosis hepática en menos de 20 años. El otro tercio evoluciona a cirrosis en 30 años. El resto de los pacientes parece evolucionar tan lentamente que no es probable que desarrollen cirrosis en su vida. Los factores que se han notificado que influyen en la tasa de evolución de la enfermedad por VHC incluyen la edad, sexo, consumo de alcohol, coinfección con VIH y esteatosis hepática.

- 50 Los síntomas específicamente indicativos de hepatopatía típicamente están ausentes hasta que se haya producido cicatrización sustancial del hígado. Sin embargo, la hepatitis C es una enfermedad sistémica y los pacientes pueden experimentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varían desde una ausencia de síntomas a una enfermedad más sintomática antes del desarrollo de hepatopatía avanzada. Los síntomas y signos generalizados asociados con hepatitis C crónica incluyen fatiga, marcada pérdida de peso, síntomas similares a la gripe, dolor muscular, artralgias, fiebres intermitentes de bajo grado, prurito, trastornos del sueño, dolor abdominal, cambios en el
- 55 apetito, náusea, diarrea, dispepsia, cambios cognitivos, depresión, dolores de cabeza y cambios de humor.

Una vez que la hepatitis C crónica ha evolucionado a cirrosis, pueden aparecer signos y síntomas que generalmente están provocados por una función hepática disminuida o bien presión incrementada en la circulación del hígado, una afección conocida como hipertensión portal. Los posibles signos y síntomas de cirrosis hepática incluyen ascitis, una tendencia a magullarse y sangrar, dolor de huesos, varices, heces grasas (esteatorrea), ictericia y un síndrome de deterioro cognitivo conocido como encefalopatía hepática.

El diagnóstico de la hepatitis C rara vez se hace durante la fase aguda de la enfermedad debido a que la mayoría de las personas infectadas no experimentan síntomas durante esta fase. Aquellos que experimentan síntomas de fase aguda rara vez están lo suficientemente enfermos para recibir atención médica. El diagnóstico de la hepatitis C crónica también es difícil debido a la ausencia o falta de síntomas específicos hasta que se desarrolla la hepatopatía avanzada, que puede que no se produzca hasta unas décadas después de la enfermedad.

El tratamiento actual ("procedimiento diagnóstico habitual") es una combinación de interferón alfa pegilado y el fármaco antivirico ribavirina durante un periodo de 24 o 48 semanas, dependiendo del genotipo vírico. Además, la eficacia de este tratamiento de combinación, en sus diversas formas, también depende del genotipo vírico y varía desde un 14 % a un 82 %. El documento WO 2006/135978A1 divulga el uso de la misma clase de compuestos de acilguanidina opcionalmente con agentes antivíricos para el tratamiento de infecciones por VHC. Los compuestos específicos BIT-225 y BIT-314 se mencionan en este documento. El documento WO 2004/112687A2 divulga el uso de derivados de guanidina, entre otros, derivados de naftoilguanidina, como compuestos antivíricos opcionalmente con agentes antivíricos para el tratamiento del VHC. Tanto A. Zekry *et al.*, Journal of Hepatology 2005, vol 42, n.º 3, 293-296 como el documento WO 2006/127360 A2 notifican el uso de interferón/peginterferón como tratamiento estándar del virus de la hepatitis C. C.A. Luscombe *et al.*, Antiviral Global Diario 2007, vol. 3, no. suppl. 2, Abstract 65, 69-70 divulga el uso sinérgico de BIT225 en combinación con INF alfa 2b recombinante (**rIFN(α -2b)**) y ribavirina en un sistema modelo *in vitro* para el VHC.

Para mejorar la posibilidad de tratamiento y prevención de las infecciones víricas, y para abordarla evolución vírica en curso, existe una necesidad en curso para identificar las moléculas que puedan inhibir diversos aspectos del ciclo de vida vírico. Por consiguiente, existe una necesidad de obtener composiciones novedosas adicionales y agentes con actividad antivírica.

Es un objetivo de la presente invención superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior o proporcionar una alternativa útil.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a determinadas composiciones, preferentemente composiciones sinérgicas, que comprenden compuestos antivíricos novedosos, útiles en el tratamiento de la infección por VHC, que se encuentran en la clasificación de acilguanidinas sustituidas. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones sinérgicas que comprenden una o más acilguanidinas sustituidas y uno o más compuestos antivíricos conocidos.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento del VHC, que comprende:

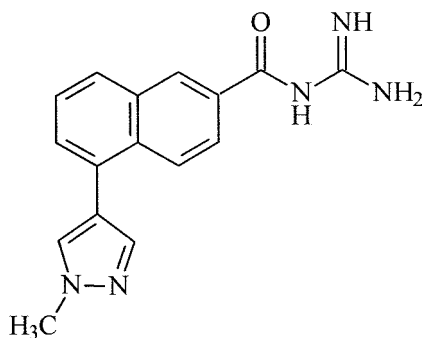
(A) 5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina o (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina,

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(B) IFN α -2b,

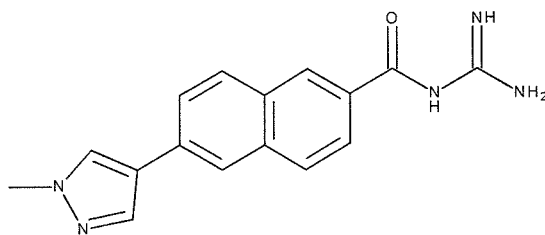
en la que:

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



BIT-225, y

(6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina tiene la estructura



BIT-314.

Ventajosamente, las composiciones de acuerdo con la presente invención son composiciones sinérgicas en las que el efecto del compuesto y el al menos un agente antivírico adicional es mayor que la suma de los efectos del compuesto y al menos un agente antivírico adicional solo.

- 5 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del VHC, que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona una composición como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso en el tratamiento de la invención para el VHC como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial, en cualquier orden.

- 10

Los componentes individuales de la composición se pueden administrar por separado de una manera secuencial y en cualquier orden.

Las composiciones y formulaciones de la presente invención se pueden administrar de cualquier manera, incluyendo pero no limitadas a, por vía intravenosa (iv), intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, transmucosa o mediante infusión por vía oral, rectal, por medio de goteo iv, parche o implante. Las composiciones pueden estar en forma de polvo, comprimido, cápsula, líquido, suspensión u otra forma de dosificación similar.

- 15

A menos que el contexto lo requiera claramente de otro modo, en toda la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprender", "que comprende" y similares se deben interpretar en un sentido inclusivo a diferencia de un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

- 20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** muestra gráficamente la inhibición de la replicación de GBV-B por BIT 225 y BIT100;

la **figura 2** muestra gráficamente una curva de respuesta a la dosis de diversas concentraciones de BIT 225 frente a BVDV;

- 25 la **figura 3** muestra gráficamente una curva de respuesta a la dosis de diversas concentraciones de IFN frente a BVDV;

la **figura 4** muestra gráficamente una curva de respuesta a la dosis de diversas concentraciones de ribavirina frente a BVDV;

la **figura 5** muestra gráficamente los niveles de la inhibición del virus observados con BIT225 31 nM y/o 1,25 µg de ribavirina en presencia de ausencia de IFNα, y

- 30 la **figura 6** muestra las curvas de respuesta a las dosis completas para BIT225 en presencia de 5 y 10 UI/m de IFNα y muestra el efecto antivírico potenciado mediante adición de 1,25 µg/ml. El encarte muestra las curvas de respuesta a la dosis completas para ribavirina en presencia de 5 y 10 UI/m de IFNα.

la **figura 7** muestra las curvas de respuesta de dosis individuales para 2'-C-metiladenosina y 2'-C-metilcitidina frente a BVDV.

- 35 las **figuras 8 y 9** muestran los cambios con respecto a las curvas de respuesta a la dosis para BIT225 en presencia de diversas concentraciones de 2'-C-metiladenosina o 2'-C-metilcitidina, respectivamente.

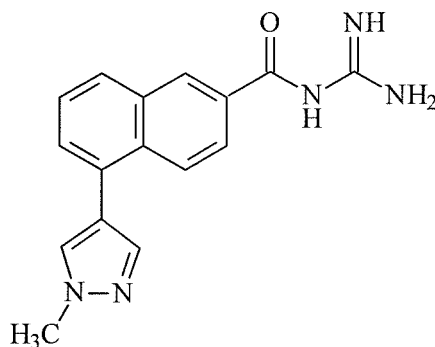
la **figura 10** muestra las curvas de respuesta a las dosis completas para BIT314 en presencia de diversas concentraciones de rIFNα-2b.

- 40 la **figura 11** ilustra el efecto antivírico potenciado mediante adición de 5 UI/m de IFNα+ 1,25 µg/ml de ribavirina y 5 UI/m de IFNα + 2,5 µg/ml de ribavirina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

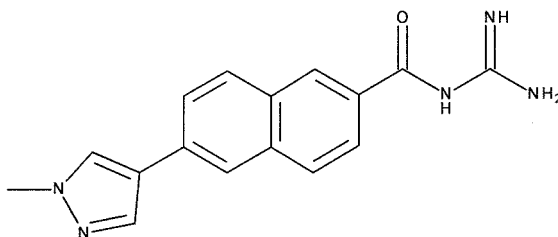
La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento del VHC que comprenden 5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina o (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con IFN α -2b, en las que:

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



5

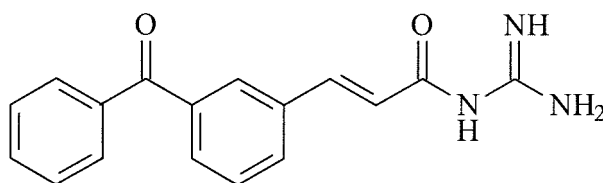
BIT-225 y (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina tiene la estructura



BIT-314.

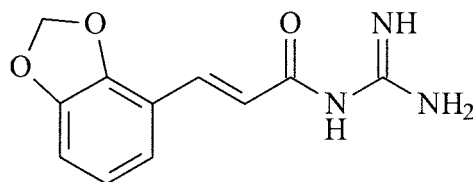
Los compuestos particularmente útiles para su uso en las composiciones de la presente invención se pueden seleccionar de los siguientes compuestos BIT-225 y BIT-314. Los compuestos adicionales divulgados en el presente documento también siguen: (3-benzoyl)cinamoilguanidina que comprende la estructura

10



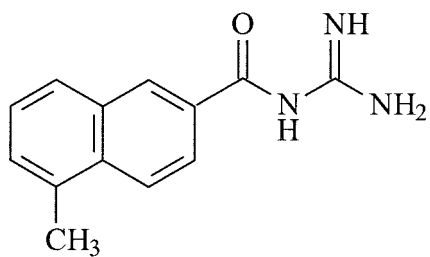
BIT-216

2,3-metilendioxicinamoilguanidina que comprende la estructura



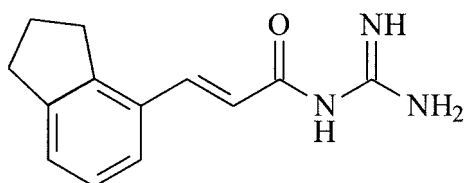
BIT-217

5-metil-2-naftoilguanidina que comprende la estructura



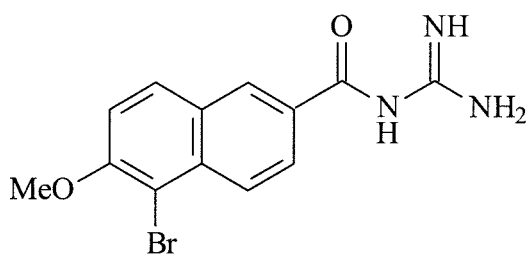
BIT-218

3(indan-4-il)-propenoilguanidina que comprende la estructura



BIT-222

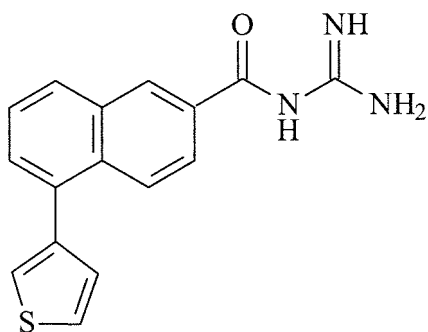
5-bromo-6-metoxi-2-naftoilguanidina que comprende la estructura



5

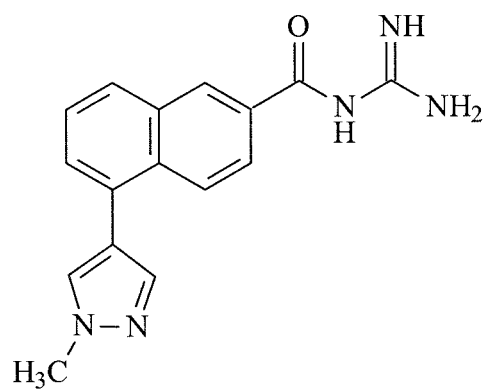
BIT-223

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



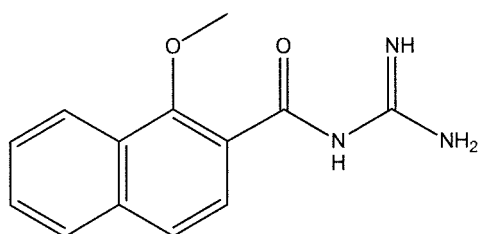
BIT-224

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



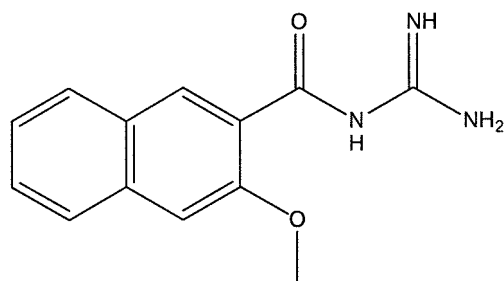
BIT-225

(1-metoxi-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



BIT-301

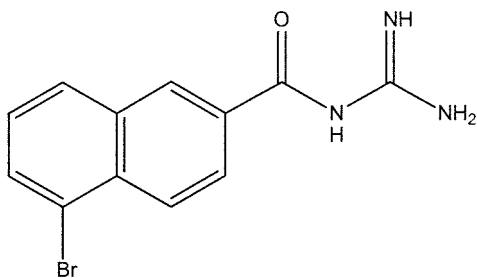
(3-metoxi-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



BIT-302

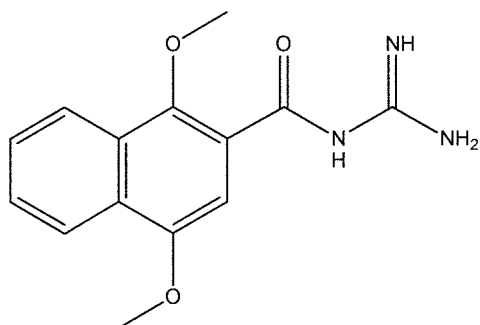
5

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



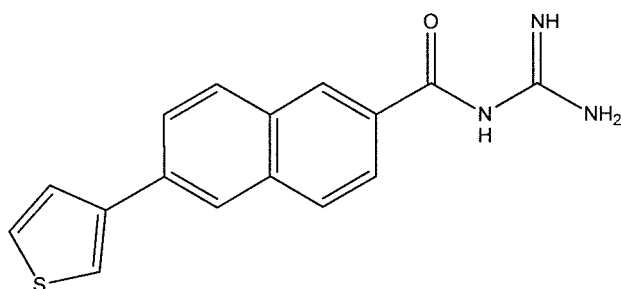
BIT-303

(1,4-dimetoxi-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



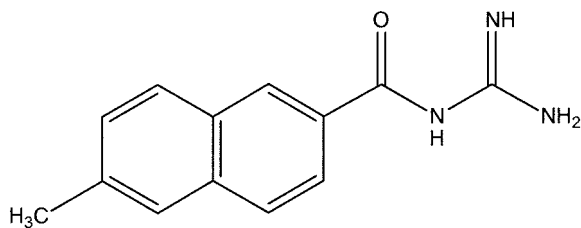
BIT-304

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



BIT-305

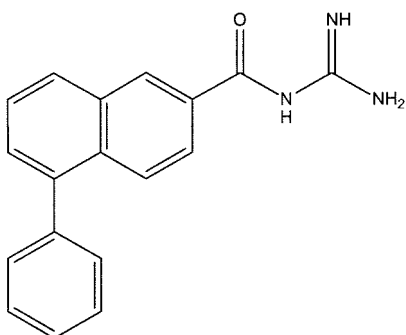
(6-metil-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



BIT-306

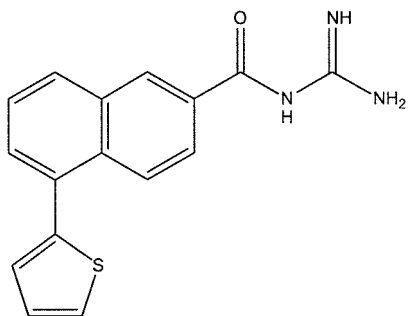
5

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



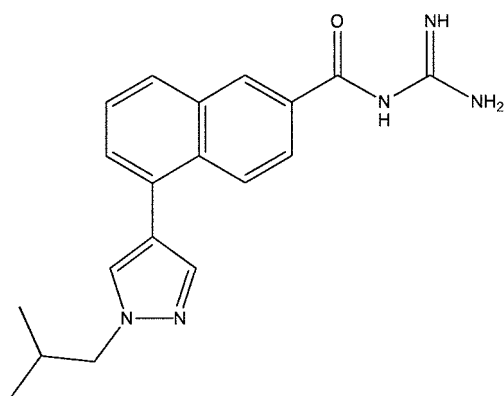
BIT-307

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



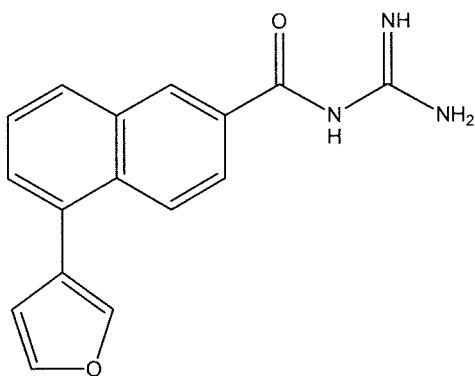
BIT-308

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



BIT-310

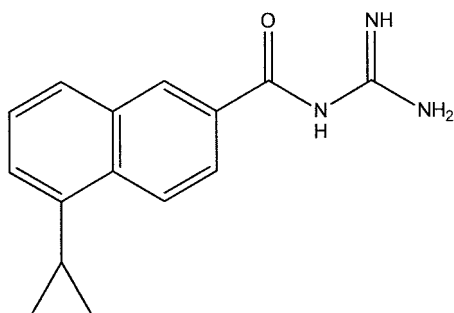
(5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina que comprende la estructura



BIT-311

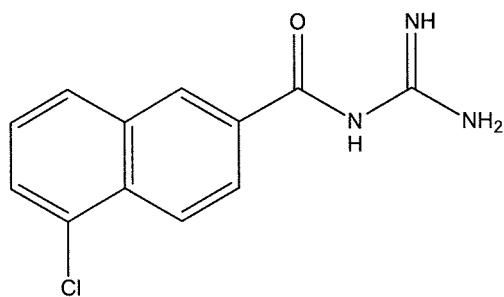
5

(5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina



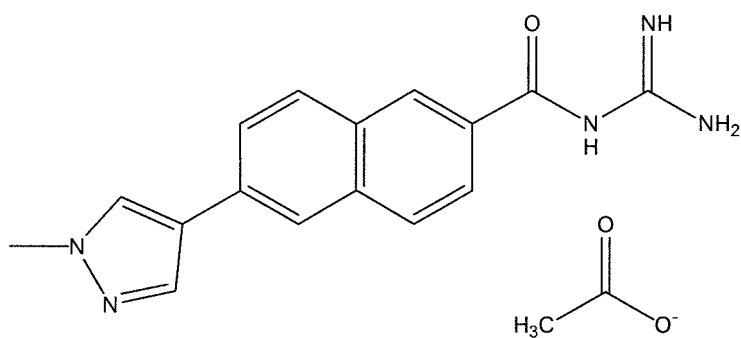
BIT-312

(5-cloro-2-naftoil)guanidina



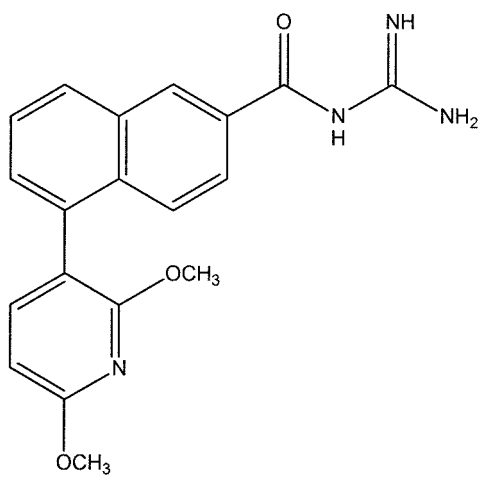
BIT-313

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



BIT-314

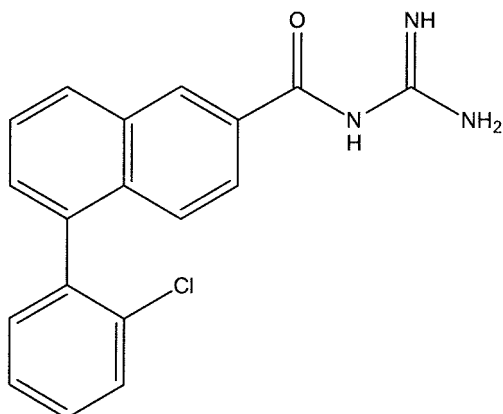
(5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina



BIT-315

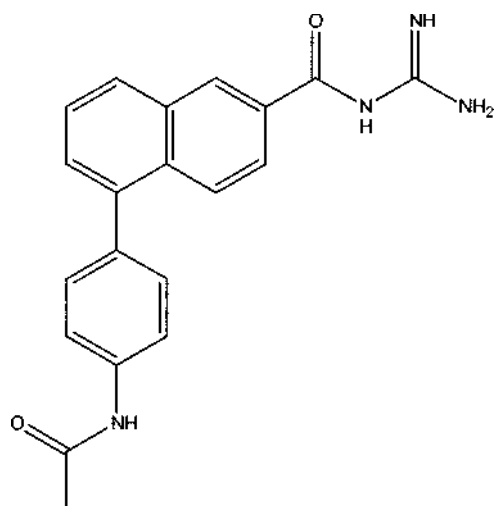
5

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



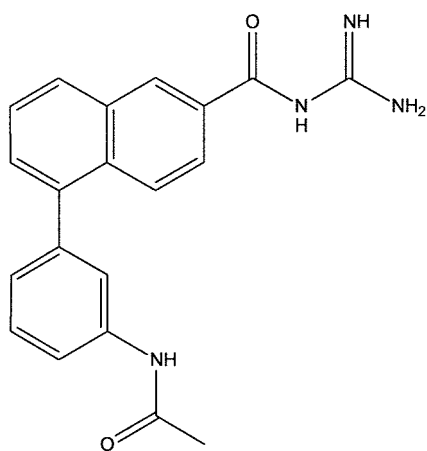
BIT-316

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



BIT-317

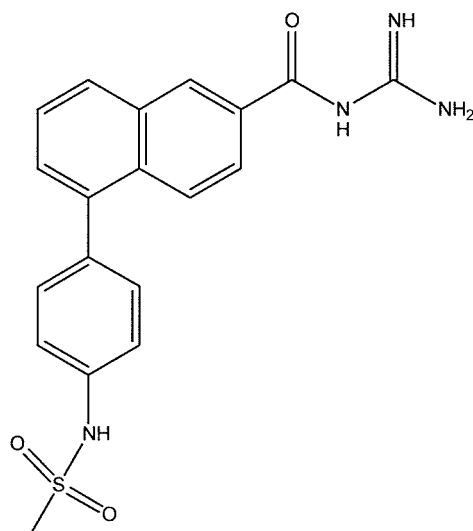
(5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina



BIT-318

5

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



BIT-319

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los grupos amina o imina de la porción de guanidilo de los compuestos divulgados en el presente documento pueden estar presentes en cualquier forma convencional usada para la provisión de dichos compuestos. Por ejemplo, pueden estar presentes como la base libre, un hidrato, una sal orgánica o inorgánica o combinaciones de los mismos.

5

Los procedimientos desarrollados para cribar los compuestos de la presente invención para la actividad antivírica se describen en detalle en el documento PCT/AU2004/000866.

La referencia a "VHC" se debe entender como una referencia a cualquier cepa del virus de la hepatitis C, incluyendo homólogos y mutantes.

10 La referencia a la "actividad funcional" del VHC se debe entender como una referencia a una cualquiera o más de las funciones que realiza el VHC o en las que está implicado.

La referencia a la "replicación vírica" se debe entender como que incluye una cualquiera o más etapas o aspectos del ciclo de vida del VHC, tal como la inhibición del ensamblaje o liberación de viriones. Por consiguiente, el procedimiento de la presente invención abarca la mediación de la replicación del VHC por medio de la inducción de una cascada de pasos que dan lugar a la mediación de uno cualquiera o más aspectos o etapas del ciclo de vida del VHC.

15

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

Se entenderá por los expertos en la técnica que los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de una composición o formulación que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20

Las composiciones descritas en el presente documento que comprenden los compuestos de la presente invención, pueden incluir en combinación uno o más agentes antivíricos adicionales de cualquier tipo, por ejemplo, un inhibidor de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) de VHC no nucleósido, un inhibidor de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) de VHC nucleósido, un inhibidor de la proteasa del ARN de VHC no nucleósido, un inhibidor de la proteasa del ARN de VHC nucleósido, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido, un inhibidor de la entrada vírica, interferón, PEG-interferón, ribavirina y combinaciones de los mismos. Se entenderá que los inhibidores nucleósidos y no nucleósidos incluyen análogos de moléculas de nucleósidos y no nucleósidos. Los inhibidores de la polimerasa pueden seleccionar como diana NS5A y NS5B del VHC; los inhibidores de la proteasa pueden seleccionar como diana NS3 y NS4 del VHC.

25

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de análogos de nucleósido de NS5B que se pueden usar en tratamientos de combinación y en las composiciones divulgadas en el presente documento incluyen valopicitabina, un profármaco de análogo de nucleósido de 2'-C-metilcitosina; JTK103; R04048; R-1479/R-1626, análogo de nucleósido de 4'-azidocitosina y profármaco de los mismos; y R-7128. Los ejemplos no limitantes de inhibidores análogos de no nucleósidos (NNRTI) que se pueden usar en las composiciones de la presente invención incluyen HCV-796, inhibidor de la polimerasa de VHC de benzofurano; GL60667 o "667"; y XTL-2125. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de serina proteasa de NS3/4A de VHC que se pueden usar en las composiciones descritas en el presente documento incluyen VX-950; SCH-503034; ACH-806/GS-9132; y BILN-2061 y ITMN-191.

35

Preferentemente, el al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica es un interferón (IFN). Todavía más preferentemente, el interferón se selecciona del grupo que consiste en IFN de tipo I y tipo II. Todavía más preferentemente, el IFN se selecciona del grupo que consiste en IFN α , IFN β y IFN γ . Todavía más preferentemente, el IFN se selecciona del grupo que consiste en IFN α -2a, IFN α -2b, IFN α -n3, IFN α con-1, IFN β -1a, IFN- β 1, IFN- γ 1B, peginterferón α -2b y peginterferón α -2a. De forma alternativa, el al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica puede comprender uno o más de IFN α -2b y ribavirina; IFN α -2a y ribavirina; IFN α -2a pegilado y ribavirina o IFN α -2a pegilado y ribavirina.

El al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica puede comprender uno o más compuestos seleccionados de un inhibidor de la proteasa de VHC, un inhibidor de la polimerasa de VHC o un inhibidor de serina proteasa de VHC. De forma alternativa, el al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica puede comprender uno o más compuestos seleccionados de un anticuerpo monoclonal, un extracto botánico, un inhibidor de NS5A, un inmunomodulador, un tiazólido, un tratamiento antifosfolípidos, un compuesto antisentido, un isatoribina, un estimulador inmunitario de amplio espectro, un inhibidor de la fibrosis/inflamación, un inhibidor de la replicasa, un inhibidor de la ciclofilina, un inhibidor de iminoazúcar, un inhibidor de la pancaspasa o un anticuerpo policlonal.

Adicionalmente, el al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica puede comprender uno o más análogos de nucleósido antivíricos, tales como, por ejemplo, análogos de nucleósido de 2'-C-metilo. Estos se pueden seleccionar, por ejemplo, de 2'-C-metiladenosina o 2'-C-metilcitidina.

El al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica también puede comprender una vacuna seleccionada de una vacuna terapéutica o una vacuna basada en ADN.

Para un tratamiento de combinación en el que se usan los compuestos de la presente invención en conjunción con uno o más agentes antagonistas de VHC o compuestos antivíricos convencionales, los compuestos se pueden proporcionar al sujeto antes de, después de, o simultáneamente con el uno o más agentes o compuestos antivíricos convencionales.

Preferentemente, la composición de la presente invención es una composición sinérgica, en la que el efecto del compuesto y al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica es mayor que la suma de los efectos del compuesto y al menos un agente adicional que tiene actividad antivírica solo. Por supuesto, se entenderá que también se contemplan combinaciones simples y aditivas de compuestos novedosos y agentes antivíricos existentes.

El objeto de la inhibición vírica es un mamífero, tal como, pero no limitado a, un ser humano, un primate, un animal de ganado, por ejemplo, una oveja, una vaca, un caballo, un asno o un cerdo; un animal de compañía, por ejemplo, un perro o un gato; un animal de pruebas de laboratorio, por ejemplo, un ratón, un conejo, una rata, un cobaya o un hámster; o un animal salvaje en cautividad, por ejemplo, un zorro o un ciervo. Preferentemente, el sujeto es un primate. Lo más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La presente invención es particularmente útil en el tratamiento y la profilaxis de una infección por VHC. Por ejemplo, en sujetos infectados con el VHC, la actividad antivírica se puede ver afectada a fin de prevenir la replicación del VHC, previniendo así la aparición de hepatitis C aguda o crónica. De forma alternativa, se puede usar el procedimiento de la presente invención para reducir la carga de VHC sérica o para aliviar los síntomas de la infección por VHC.

La presente invención puede ser particularmente útil, en las etapas tempranas de la infección por VHC para prevenir el establecimiento de un reservorio de VHC en las células afectadas o bien como un tratamiento profiláctico que se va a aplicar inmediatamente antes de o durante un periodo después de la exposición a una posible fuente de VHC.

La referencia en el presente documento a "terapéutico" y "profiláctico" se ha de considerar en sus contextos más amplios. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un mamífero se trate hasta su recuperación total. Del mismo modo, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no contraiga finalmente una condición de enfermedad. Por consiguiente, el tratamiento y la profilaxis incluyen la mejoría de los síntomas de una afección particular o prevención o de otro modo la reducción del riesgo de desarrollar una afección particular. El término "profilaxis" se puede considerar como que reduce la gravedad de la aparición de una afección particular. El tratamiento también puede reducir la gravedad de una afección existente o la frecuencia de ataques agudos.

De acuerdo con la presente invención, se puede coadministrar más de una composición con uno o más de otros agentes terapéuticos. Por "coadministrado" se quiere decir la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes por medio de las mismas vías o diferentes o administración secuencial mediante las mismas vías o diferentes. Por administración "secuencial" se quiere decir una diferencia temporal de segundos, minutos, horas o días entre la administración de un compuesto y el siguiente. La composición y los agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en cualquier orden.

Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa (iv), intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, transmucosa o mediante infusión por vía oral, rectal, mediante goteo iv, parche e implante. Son particularmente preferentes las vías intravenosas.

La presente invención también se extiende a formas adecuadas para su aplicación tópica, tales como cremas, lociones y geles.

En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona una formulación para su administración pulmonar o nasal para el tratamiento del VHC que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

- Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas unitarias de dosificación para su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación novedosas de la invención está dictada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las composiciones.

- Los procedimientos para la preparación de formas unitarias de dosificación y preparaciones tópicas están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica a partir de obras, tales como *Pharmaceutical Handbook. A Martindale Companion Volume Ed. Ainley The Nineteenth Edition The Pharmaceutical Press London, CRC Handbook of Chemistry and Physics Ed. Robert C. Weast Ph D. CRC Press Inc.; Goodman and Gilman's; The Pharmacological basis of Therapeutics. Ninth Ed. McGraw Hill; Remington; and The Science and Practice of Pharmacy. Nineteenth Ed. Ed. Alfonso R. Gennaro Mack Publishing Co. Easton Pennsylvania.*

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

- La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a ejemplos específicos pero no limitantes que describen los protocolos sintéticos, inhibición vírica y otras propiedades antivíricas de los compuestos de la presente invención. La síntesis y el cribado para determinar compuestos que tienen actividad antivírica se pueden lograr mediante la gama de metodologías descritas en el presente documento o descritas en más detalle en el documento PCT/AU2004/000866.

Se ha de entender, sin embargo, que la descripción detallada de los procedimientos, compuestos y procedimientos específicos se incluye solamente con el propósito de ejemplificar la presente invención.

EJEMPLOS

- La actividad antivírica de todos los compuestos de la presente invención puede ser, y ha sido averiguada usando los procedimientos descritos en el presente documento o descritos en detalle en el documento PCT/AU2004/000866. Adicionalmente, se pueden usar los procedimientos para la síntesis de los compuestos de la invención, genéricos como específicos, descritos en el presente documento, descritos en publicaciones de referencia o de otro modo conocidos por los expertos en la técnica, para preparar todos los compuestos de la presente invención. También se proporcionan protocolos sintéticos útiles en el documento PCT/AU2006/000880.

- Más específicamente, se pueden sintetizar acilguanidinas mediante una variedad de procedimientos que incluyen hacer reaccionar guanidina (generalmente generada *in situ* a partir de su sal de clorhidrato) con un derivado adecuadamente activado de un ácido carboxílico. Los ejemplos incluyen:

- i) síntesis a partir de cloruros de ácido, ejemplificadas por Yamamoto *et al*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, 45, 1282
- ii) síntesis a partir de ésteres simples, ejemplificada por la patente de EE. UU. 2,734,904.
- iii) síntesis a partir de ácidos carboxílicos, por medio de activación *in situ* mediante carbonildiimidazol, ejemplificada por la patente de EE. UU. 5,883,133

- Los precursores de ácidos carboxílicos requeridos para la preparación de las acilguanidinas descritas en el presente documento se obtuvieron mediante una variedad de diversos procedimientos. Un gran número de ácidos cinámicos sustituidos están disponibles comercialmente. Además, se describen bien numerosos procedimientos para la síntesis de ácidos cinámicos sustituidos y sus ésteres simples en la técnica, incluyendo:

- i) La reacción de ácido malónico con un aldehído aromático y base (la condensación de Doebner), descrita en *Chemical Reviews*, 1944, 35, 156, y las referencias contenidas en el mismo.
- ii) La reacción de anhídrido acético con un aldehído aromático y base (la reacción Perkin), descrita en *Organic Reactions*, 1942, 1, 210, y las referencias contenidas en el mismo.
- iii) La reacción de ácido acrílico y ésteres simples del mismo con un haluro aromático o triflato aromático usando catalizador de paladio (la reacción de Heck), descrita en *Organic Reactions*, 1982, 28, 345, y las referencias contenidas en el mismo.

- iv) La reacción de un fosfonoacetato de trialquilo con un aldehído aromático y base (la reacción de Horner-Emmons), descrita en *Organic Reactions*, 1977, 25, 73, y las referencias contenidas en el mismo.

Una serie de ácidos naftoicos sustituidos con halo, hidroxi y alcoxi simples están disponibles comercialmente o bien son conocidos en la técnica y proporcionaron los materiales de partida para las naftoilguanidinas sustituidas.

- 5 Los ácidos naftoicos que están sustituidos con alquilo, cicloalquilo, arilo y grupos heterocíclicos a menudo se pueden preparar haciendo reaccionar un ácido halonaftoico con un reactivo organometálico adecuado usando un catalizador de metal de transición. Una de dichas variantes de esta metodología que se usó para preparar una serie de ácidos naftoicos sustituidos usados como precursores de las naftoilguanidinas descritas en el presente documento, fue la reacción formadora de enlaces carbono-carbono catalizada por paladio entre ácidos bromonaftoicos y un ácido borónico
- 10 sustituido adecuadamente (o éster de boronato) que se conoce ampliamente en la técnica como el acoplamiento de Suzuki (descrito en *Chemical Reviews*, 1995, 95, 2457 y referencias en las mismas). La reacción tiene una amplia aplicación y se puede usar en una gama de halonaftalenos sustituidos que luego se pueden elaborar adicionalmente para introducir o destapar el grupo ácido carboxílico requerido.

1. Metodología sintética general

15 1.1 Procedimiento general A - Preparación de triflatos de arilo

- Se añadió lentamente a una solución del fenol (10 mmol) en piridina (7 ml) a 0 ° C anhídrido trifluorometanosulfónico (11 mmol, 1,1 eq). Se agitó la mezcla resultante a 0 ° C durante unos 5 minutos adicionales antes de dejar que se calentara a temperatura ambiente y se agitó hasta que el análisis de TLC mostró que el fenol de partida se había consumido. Luego se vertió la mezcla en agua y se extrajo con acetato de etilo (x3). Se lavaron secuencialmente los
- 20 extractos combinados con agua, ácido clorhídrico acuoso 1 M, agua y salmuera, luego se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío para dar el producto en bruto. Los productos en bruto se sometieron a cromatografía sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los triflatos de arilo deseados, generalmente como aceites incoloros.

1.2 Procedimiento general B - ésteres de cinamato a través de la reacción de Heck de triflatos

- 25 Se calentó una mezcla del triflato de fenilo (10 mmol), acrilato de metilo (14 mmol, 1,4 eq), trietilamina (40 mmol, 4 eq) y diclorobis(trifenilfosfina)paladio (0,3 mmol, 0,03 eq) en dimetilformamida (30 ml) a 90 °C. Se supervisó la reacción mediante CG/EM y se añadieron lotes recién preparados de acrilato de metilo (1 eq), trietilamina (2 eq) y el catalizador de paladio (0,03 eq) según se requería, en un esfuerzo para forzar la reacción hasta la finalización. Luego se vertió la mezcla en agua y se extrajo con una mezcla 1:1 de éter dietílico/hexanos (x3). Se lavaron los extractos combinados con
- 30 agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron a través de una almohadilla de gel de sílice y el filtrado se concentró a vacío para dar el producto en bruto como un aceite. Los productos en bruto se sometieron a cromatografía sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de metilo deseados, generalmente como aceites incoloros.

1.3 Procedimiento general C - ésteres de cinamato a través de la reacción de Heck de bromuros

- 35 Se añadió el bromuro de arilo (10 mmol), acetato de paladio (0,1 mmol, 0,01 eq) y tri-*o*-tolilfosfina (0,4 mmol, 0,04 eq) al matraz de reacción y se purgó con nitrógeno. A esto, luego se añadieron acrilato de metilo (12,5 mmol, 1,25 eq), trietilamina (12,5 mmol, 1,25 eq) y dimetilformamida (1 ml) y se calentó la mezcla a 100 °C. Se supervisó la reacción mediante CG/EM y se añadieron lotes recién preparados de acetato de paladio (0,01 eq), tri-*o*-tolilfosfina (0,04 eq), acrilato de metilo (1,25 eq) y trietilamina (1,25 eq) se añadieron según se requería, en un esfuerzo para forzar la
- 40 reacción hasta la finalización. Se vertió la mezcla en agua y se extrajo con una mezcla 1:1 de éter dietílico/hexanos (x4). Se lavaron los extractos combinados con agua, luego con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron a través de una almohadilla de gel de sílice y el filtrado se concentró a vacío para dar el producto en bruto. Los productos en bruto se sometieron a cromatografía sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de metilo deseados, generalmente como aceites incoloros.

45 1.4 Procedimiento general D - ésteres de cinamato a través de la reacción de Horner-Emmons

- Se añadió una solución de fosfonoacetato de trietilo (13 mmol, 1,3 eq) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml), durante 5 minutos a una suspensión de hidruro de sodio (14,3 mmol, 1,4 eq) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a 0 °C en nitrógeno. Luego se agitó la mezcla a 0 °C durante 20 minutos. Luego se añadió una solución de benzaldehído (10 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml) durante 10 minutos a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante otros 30 minutos
- 50 antes dejarla en agitación a temperatura ambiente hasta que el análisis de CG/EM o TLC mostró que el material de partida de benzaldehído se había consumido. Típicamente, se dejaron en agitación las reacciones a temperatura ambiente durante la noche para garantizar el consumo completo del aldehído de partida. Se vertió la mezcla en agua, se separó la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (x3). Se lavaron con agua los extractos orgánicos combinados, luego salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío para dar el producto en bruto.
- 55 Los productos en brutose sometieron a cromatografía sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los cinamatos de etilo deseados, generalmente como aceites incoloros.

1.5 Procedimiento general E - preparación de ésteres de 5-fenilpenta-2,4-dienoico

Se añadió una solución de 4-fosfonocrotonato de trietilo (26 mmol, 1,3 eq) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml), durante 5 minutos, a una suspensión de hidruro de sodio (28 mmol, 1,4 eq, suspensión al 60 % en aceite) en tetrahidrofurano anhidro (15 ml) a 0 °C en nitrógeno. Luego se agitó la mezcla a 0 °C durante 20 minutos. Luego se añadió una solución de benzaldehído (20 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) durante 10 minutos a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 30 minutos adicionales y luego se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que el análisis de CG/EM o TLC mostró que el aldehído de partida se había consumido. Se vertió la mezcla en agua, se separó la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (x3). Se lavaron con agua los extractos orgánicos combinados, luego salmuera, se secaron (MgSO_4) y se concentraron a vacío para dar el éster de etilo en bruto como un aceite. Los productos en bruto se sometieron a cromatografía sobre gel de sílice. La elución con una mezcla de acetato de etilo/hexanos dio los ésteres de etilo deseados, como aceites incoloros.

1.6 Procedimiento general F - hidrólisis de ésteres

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

1.7 Procedimiento general G - reacciones de Suzuki de ácidos bromonaftoicos

Se añadieron el ácido bromo-2-naftoico (2 mmol), el ácido borónico apropiado (o éster de boronato) (2,2 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,1 mmol), y carbonato de sodio sólido (6,8 mmol) al matraz de reacción que luego se purgó con nitrógeno. Se añadieron acetonitrilo (6 ml) y agua (2,5 ml) y se calentó la mezcla a reflujo con agitación vigorosa hasta que el ácido bromo-2-naftoico de partida se había consumido. Luego se repartió la mezcla de reacción entre tolueno (50 ml) y solución de hidróxido de sodio 0,5 M (100 ml). Se lavó la capa acuosa con tolueno (para eliminar cualquier trifenilfosfina, 3 x 20 ml), luego se acidificó a pH 1 con ácido clorhídrico concentrado. Se extrajeron los derivados de ácido naftoico en acetato de etilo (4 x 20 ml). Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados con agua (3 x 20 ml) y salmuera (10 ml), luego se secaron (MgSO_4) filtraron y concentraron. Se analizó el residuo mediante RMN de ^1H y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (si se requirió).

1.8 Procedimiento general H - preparación de acilguanidinas

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

2. Ejemplos experimentales específicos de síntesis**40 Ejemplo 1: 4-hidroxiindano**

Se añadió 4-aminoindano (3,0 g) a una solución de ácido sulfúrico concentrado (2,4 ml) en agua (15 ml). Se añadió más agua (15 ml) y se enfrió la mezcla a 5 °C. Se añadió una solución de nitrito de sodio (1,71 g) en agua (4,5 ml) en porciones a la mezcla mientras se mantenía la temperatura por debajo de 5 °C. Después de que se finalizó la adición, se dejó que la mezcla se calentara a temperatura ambiente y se añadió urea (0,29 g). Se agitó la mezcla durante 5 minutos adicionales antes de calentarse a 45 °C durante 30 minutos. Luego se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con hidróxido de sodio acuoso 2 M (2x100 ml) y luego se acidificaron estos extractos acuosos con ácido clorhídrico y se extrajeron con acetato de etilo (3x100 ml). Luego se lavaron con salmuera los extractos orgánicos combinados y se secaron (Na_2SO_4) antes de concentrarse a vacío. Se sometió a cromatografía el producto en bruto resultante sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:7) dio 4-hidroxiindano como un aceite naranja (1,0 g).

Ejemplo 2: Triflato de 4-indanilo

Se añadió lentamente a una solución de 4-hidroxiindano (1,2 g, 8,9 mmol) en piridina (5 ml) a 0 °C anhídrido trifluorometanosulfónico (1,6 ml, 9,8 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 0 °C durante 5 minutos antes que se dejara calentar a temperatura ambiente y luego se agitó durante 45 minutos. Luego se vertió la mezcla en agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Se lavaron secuencialmente los extractos combinados con agua, ácido clorhídrico

acuoso 1 M, agua y salmuera, luego se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a *vacío* para dar el triflato en bruto como un aceite naranja (2,13 g, 89 %).

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

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

Ejemplo 4: 3-benzoilcinamato de metilo

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

25 Ejemplo 5: Ácido 3-benzoilcinámico

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

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

- Se evacuó una mezcla de ácido 5-bromo-2-naftoico (2,12 g, 8,44 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (1,84 g, 8,86 mmol), y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (502 mg, 0,435 mmol) en un matraz de fondo redondo de 250 ml y se purgó con nitrógeno (en tres ciclos). Se añadieron acetonitrilo (40 ml) y carbonato de sodio acuoso 2 M (10 ml) a la mezcla por medio de una jeringa y se calentó a reflujo la mezcla en nitrógeno durante 22 horas. Se dejó enfriar la mezcla de reacción antes de la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 M (30 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO_4), se filtraron y se concentraron a *vacío* para proporcionar un producto en bruto (2,98 g después de secado al aire). Se disolvió este material en bruto en etanol caliente (150 ml) y se filtró mientras estaba caliente para eliminar una impureza amarilla (120 mg). Se concentró el filtrado a *vacío* y se recrystalizó el residuo a partir de diclorometano (30 ml) para proporcionar ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico como un sólido blanco (724 mg, 34 %). Se obtuvo una segunda tanda de ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico (527 mg, 25 %) a partir de los licores madre concentrados mediante recrystalización a partir de diclorometano (20 ml).

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

- Se añadió cloruro de oxalilo (1,1 ml, 13 mmol) a una solución de ácido 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoico (1,19 g, 4,71 mmol) en diclorometano anhidro (200 ml (que se añadió en porciones durante la reacción para efectuar la disolución)) que contenía dimetilformamida (2 gotas) en nitrógeno y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4,25 horas. Se calentó la mezcla de reacción durante 1 hora a 40 °C, antes de concentrarse a presión reducida. Se suspendió el cloruro de ácido en bruto resultante en tetrahidrofurano anhidro (50 ml) y se añadió gota a gota esta mezcla a una solución de clorhidrato de guanidina (2,09 g, 21,9 mmol) en hidróxido de sodio acuoso 2 M (15 ml, 30 mmol) y luego se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con cloroformo (3 x 30 ml) seguido de acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavaron secuencialmente los extractos orgánicos combinados con hidróxido de sodio acuoso 1 M (60 ml) y agua (40 ml), luego se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a *vacío* para dar un sólido cristalino (1,45 g después de secar a alto *vacío*). Se disolvió este sólido en diclorometano que luego se dejó evaporar lentamente para dar 5-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-2-naftoilguanidina como un sólido amarillo (1,15 g, 83 %).

Ejemplo 8: 2,3-metilendioxycinamato de etilo

- Se añadió gota a gota fosfonoacetato de trietilo (4,05 ml, 20,2 mmol) a una suspensión agitada de hidruro de sodio (0,80 g, 20 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml) a 0 °C en nitrógeno. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 20 minutos. Se añadió gota a gota una solución de 2,3-metilendioxi-benzaldehído (2,50 g, 16,7 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla durante 2 horas, tiempo durante el que se dejó calentar a temperatura ambiente. Se vertió la mezcla en agua (250 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se secaron (MgSO_4) y se concentraron a vacío. Se sometió a cromatografía el producto en bruto sobre gel de sílice. La elución con acetato de etilo/hexanos (1:10) dio 2,3-metilendioxicinamato de etilo como un sólido incoloro (3,50 g, 92 %).

Ejemplo 9: Ácido 2,3-metilendioxicinámico

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

15 Ejemplo 10: 2,3-metilenedioxicinamoilguanidina

- Se añadió cloruro de oxalilo (0,68 ml, 7,8 mmol) a una suspensión de ácido 2,3-metilendioxicinámico (500 mg, 2,6 mmol) en diclorometano (5 ml) que contenía una gota de dimetilformamida. Se agitó la mezcla durante 2,5 horas y se evaporó la solución resultante a sequedad a presión reducida. Se disolvió el residuo en tetrahidrofurano seco (5 ml) y se añadió a una solución de clorhidrato de guanidina (1,24 g, 13 mmol) en hidróxido de sodio acuoso 2 M (8 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió cloroformo. Se recogió el precipitado resultante de producto en bruto (100 mg) mediante filtración. Se extrajo el filtrado con cloroformo (3 x 30 ml) y acetato de etilo (20 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con hidróxido de sodio acuoso 2 M (20 ml), agua (20 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a presión reducida para dar una cantidad adicional de producto en bruto (400 mg). Se combinaron las dos tandas de producto en bruto, se suspendieron en cloroformo (10 ml) y se agitaron vigorosamente durante 20 minutos. Se recogió la 2,3-metilenedioxicinamoilguanidina resultante (420 mg) mediante filtración y se secó a vacío.

Ejemplo 11: Actividad antivírica de compuestos usando el procedimiento de bioensayo bacteriano

- El procedimiento de bioensayo bacteriano usado en el presente ejemplo para someter a prueba la actividad antivírica de los compuestos frente a diferentes dianas víricas se describió en detalle en el documento PCT/2004/000866. Se usa este ensayo en cojunción con los ensayos de GBV-B y BVDV descritos a continuación, para garantizar que se identifican todos los compuestos activos, algunos de los cuales son activos en uno u el otro de los ensayos, mientras que algunos compuestos pueden ser activos en ambos ensayos.

- En resumen, el bioensayo bacteriano para cribar compuestos anti-VHC potenciales se basa en la proteína de canal iónico p7 del VHC. p7 es una pequeña proteína de membrana codificada por el VHC, que tiene una actividad funcional que sustenta la replicación y/o el crecimiento vírico.

- El fragmento de ADNc sintético que codifica p7, cDp7.coli, en el que los codones se optimizaron para la expresión de la proteína p7 en E. coli, se clonó en el plásmido de expresión pPL451, creando el vector pPLp7, en el que la expresión de p7 se induce por la temperatura, tal como se describe en detalle en el documento PCT/2004/000866. Se observó la inhibición del crecimiento de las células de E. coli que expresan p7 a 37 °C como un indicador de la función del canal iónico p7 que disipa el gradiente de Na^+ normal mantenido por las células bacterianas. Los halos de crecimiento alrededor de un sitio de aplicación del compuesto particular indican que el compuesto ha inhibido la expresión de la actividad del canal iónico p7 que previene el crecimiento en ausencia del compuesto.

Los resultados acumulativos de las pruebas de bioensayos bacterianos obtenidos durante un periodo de tiempo y promediados, se resumen en la tabla 1 a continuación.

45 Tabla 1: Puntuaciones de ensayo de bioensayos bacterianos medias para los compuestos de la invención

Puntuación de ensayo bacteriano promedio		
Nombre del compuesto	N.º BIT	p7 del VHC
(3-benzoil)cinamoilguanidina	216	1,3
2,3-metilenedioxicinamoilguanidina	217	1,0
5-metil-2-naftoilguanidina	218	1,7
3(indan-4-il)-propenoilguanidina	222	2,0

5-bromo-6-metoxi-2-naftoilguanidina	223	0,5
5-tiofen-3-il-2-naftoilguanidina	224	1,10
5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina	225	1,20
3,4-diclorocinamoilguanidina	300	1,12
(1-metoxi-2-naftoil)guanidina	301	0,25
(3-metoxi-2-naftoil)guanidina	302	0,76
(5-bromo-2-naftoil)guanidina	303	0,62
(1,4-dimetoxi-2-naftoil)guanidina	304	0,60
(6-(3-tienil)-2-naftoil)guanidina	305	0,08
(6-metil-2-naftoil)guanidina	306	0,07
(5-fenil-2-naftoil)guanidina	307	0,46
(5-(tien-2-il)-2-naftoil)guanidina	308	0,55
(5-(1-isobutil-1H-pirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina	310	0,36
(5-(3-furil)-2-naftoil)guanidina	311	0,81
(5-ciclopropil-2-naftoil)guanidina	312	1,00
(5-cloro-2-naftoil)guanidina	313	1,30
acetato de (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidinio	314	4,03
(5-(2,6-dimetoxipiridin-3-il)-2-naftoil)guanidina	315	0,20
(5-(2-clorofenil)-2-naftoil)guanidina	316	0,37
(5-(4-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina	317	0,06
(5-(3-(acetilamino)fenil)-2-naftoil)guanidina	318	0,73
(5-(4-((metilsulfonil)amino)fenil)-2-naftoil)guanidina	319	0,10
CONTROL POSITIVO DE ENSAYO		
(3-bromocinamoil)guanidina	BIT06 7	2,00
5-bromo-2-fluorocinamoilguanidina	BIT12 4	2,70

Se usaron los controles positivos en este ensayo para garantizar que el ensayo funcionaba en lugar de para la comparación de las actividades relativas de los compuestos. Un resultado por encima de cero indica que el compuesto tiene actividad antivírica potencial.

Ejemplo 12 - Someter a prueba los inhibidores de p7 frente al virus de hepatitis C.

- 5 Someter a prueba la eficacia antivírica de nuevos fármacos frente al VHC potenciales se hace difícil por la falta de un sistema modelo de cultivo celular generalmente accesible para el VHC. Se sometieron a prueba los inhibidores de p7 propuestos usando sistemas de flavivirus sustitutos, en particular, GBV-B y BVDV (virus de la diarrea vírica bovina).

- 10 GBV-B es el flavivirus más estrechamente relacionada con el VHC, que comparte un 27-33 % de identidad de secuencia nucleotídica y un 28 % de similitud aminoacídica sobre la secuencia polipeptídica completa. Este virus representa un excelente sistema sustituto para el VHC porque infecta a pequeños primates del nuevo mundo y se replica eficazmente *in vitro* en cultivos de hepatocitos de tíft primarios (PMH). El homólogo de GBV-B de la p7 del VHC se denomina p13. En el presente documento se muestra que un péptido sintético correspondiente a las dos hélices transmembranarias terminales del extremo C de p13 (que comparten la mayor homología con p7) forma un canal iónico selectivo a cationes que, como el canal p7, está bloqueado por amantadina (Premkumar *et al.*, 2006). Por otra parte, a diferencia de p7,
- 15 HMA no inhibe los canales p13. Estas observaciones confirman que los dos canales homólogos comparten características estructurales similares, pero no idénticas.

Los compuestos de BIT seleccionados -identificados mediante cribado de ensayos bacterianos para los inhibidores de p7 del VHC- se sometieron a prueba para determinar su capacidad de inhibir la replicación del GBV-B en hepatocitos de titi primarios (véase la figura 1). Se inocularon los hepatocitos 3 días después de la siembra con $10 \times \text{TCID}_{50}$ de GBV-B en suero de titi positivo. Se adsorbió el VHC durante dos horas y luego se lavaron las células tres veces y se cultivaron durante dos días en medio libre de suero recién preparado (SFM) complementado con hormonas y factores de crecimiento. Se midió el virus liberado al sobrenadante de cultivo como el número de copias de ARN vírico, determinado mediante RT-PCR en tiempo real. Se añadieron los compuestos -disueltos en DMSO- al medio, 30 minutos antes de la inoculación del virus ("pretratamiento") o bien inmediatamente después de las etapas de inoculación y lavado ("postratamiento"). Se incluyeron ningún control, negativo (solo DMS O) y positivo ($10 \mu\text{g/ml}$ poly I:C) en los experimentos. Se sometió a prueba la citotoxicidad de los compuestos hacia los hepatocitos por medio de un ensayo MTT estándar.

El resultado más sorprendente fue en las células pretratadas con $20 \mu\text{M}$ de BIT225, en las que se no detectó ningún virus en el sobrenadante de cultivo. $20 \mu\text{M}$ de BIT100 redujeron la replicación del virus en más de 1,0 log e inhibieron el virus más fuertemente que el control positivo poli I:C. La eficacia de tanto BIT225 como BIT100 se redujeron algo cuando se añadieron los compuestos después de la inoculación, lo que sugiere que los compuestos pueden actuar en una etapa muy temprana del ciclo de vida del virus. Ninguno de los compuestos en la figura 1 mostró citotoxicidad frente a los hepatocitos a $20 \mu\text{M}$.

BVDV pertenece al género Pestivirus de Flaviviridae y se usa ampliamente como sistema modelo sustituto para la identificación de potenciales agentes antivíricos frene al VHC debido a las muchas similitudes de su estructura genómica, productos génicos y ciclos de replicación. Además, a diferencia de GBV-B, que únicamente se puede cultivar en hepatocitos primarios, BVDV se cultiva fácilmente en cultivo tisular y las cepas usadas comúnmente son citopáticas, lo que las convierte en prueba fácil de fármacos antivíricos. El homólogo de la p7 del VHC de BVDV ha demostrado que forma un canal iónico y que es esencial para la generación de partículas infecciosas de virus (Harada *et al*, 2000 y Griffin *et al*, 2005).

La evaluación antivírica de los compuestos BIT seleccionados frente BVDV se externalizó a Southern Research Institute (SRI), Fredrick MD EE. UU. Se usa un formato de citoprotección simple en el que se evalúa la eficacia antivírica de los compuestos por su capacidad para reducir el efecto citopático de la infección por BVDV en células de riñón bovino Madin-Darby (Buckwold *et al*, 2003)

Se empleó un procedimiento de ensayo de inhibición de los efectos citopatógenos (CPE) inducidos por virus para evaluar compuestos frente a su actividad antivírica frente a la cepa del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) NADL, en células de riñón bovino Madin Darby (MDBK) pasadas en matraces T-75 (1,2). Se diseñaron ensayos antivíricos para someter a prueba la mitad de seis concentraciones logarítmicas de cada compuesto por triplicado frente al virus de exposición. Los controles celulares (CC) que contenían solo medio, los controles celulares infectados con virus que contenían medio y virus, los controles de citotoxicidad de fármacos que contenían medio y cada concentración de fármaco, los controles de reactivo que contenían solo medio de cultivo (sin células) y los controles colorimétricos o infectados de fármacos que contienen fármaco y medio (sin células) se ejecutan simultáneamente con las muestras de prueba. Se usó el interferon- α 2b humano como compuesto de control positivo. En el día anterior al ensayo, las células se tripsinizaron. se sedimentaron, se contaron y se resuspendieron a 1×10^4 /pocillo en medio de cultivo tisular en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de $100 \mu\text{l}$ por pocillo. Un día después de sembrar las células, se lavaron los pocillos y se reemplazó el medio con medio completo (suero al 2 %) que contenía diversas concentraciones de compuesto de prueba diluido en medio en una serie mitad logarítmica. Se eliminó una alícuota de pretitulada del virus del congelador (-80°C) justo antes de cada experimento. El virus se diluyó en medio de cultivo tisular de tal manera que la cantidad de virus añadido a cada pocillo diera la muerte celular completa a los 6-7 días después de la infección. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO_2 hasta que se observó CPE máximo en los cultivos de control de virus no tratado (~ día 7). Se determinó la inhibición de CPE por el compuesto usando Cell Titer 96 (Promega). Se usó un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables. Se usó un programa de ordenador para calcular el porcentaje de reducción de CPE de pocillos infectados por el virus y el porcentaje de viabilidad celular de los pocillos de control de fármaco no infectados. Se calcularon la concentración de fármaco inhibidora mínima que reduce el CPE en un 50 % (CI_{50}) y la concentración de fármaco tóxica mínima que provoca la reducción de células viables en un 50 % (CT_{50}) usando un programa de análisis de regresión con ajuste de curva semilogarítmica. Se determinó un índice (selectividad) terapéutico (IT_{50}) para cada compuesto activo dividiendo la CT_{50} por la CI_{50} .

Se midió por separado la citotoxicidad del fármaco en células no infectadas. Se sometieron a prueba once compuestos BIT en el primer experimento en el que se añadieron los compuestos a las células justo antes de la infección y se mantuvieron durante todo el experimento. Dos de ellos, BIT225 y BIT314, regresaron a valores de IC_{50} submicromolares (véase la tabla 2 a continuación).

Compuesto	CI_{54}	CT_{59}	AI
BIT-225	$0,53 \mu\text{M}$	$11,6 \mu\text{M}$	21,7

BIT-300	N/A	3,69 μ M	N/A
BIT-124	N/A	5,21 μ M	N/A
BIT-33	3,64 μ M	25,2 μ M	6,91
BIT-143	4,66 μ M	17,0 μ M	3,65
BIT-93	16,7 μ M	>30,0 μ M	>1,80
BIT-123	N/A	9,92 μ M	N/A
BIT-137	N/A	16,5 μ M	N/A
BIT-110	N/A	16,8 μ M	N/A
BIT-314	0,21 μ M	11,6 μ M	54,2
BIT-223	4,38 μ M	>30,0 μ M	>6,85
IFN- α	20,6 UI/ml	> 500 UI/ml	>24,3

N/A = no logrado

Tabla 2 - Eficacia antivirica frente a BVDV en células MDBK

Un ensayo de repetición posterior con BIT225 regresó a un valor de IC₅₀ similar de 0,33 μ M. También se sometieron a prueba compuestos adicionales de la invención, como se muestra en la tabla 2a a continuación.

5	N.º BIT	BVDV CI50 μ M
	BIT314	0,39
	BIT313	9,64
	BIT225	1,27
	BIT312	8,63
10	BIT311	2,96
	BIT302	7,21
	BIT318	>20
	BIT306	14,5
	BIT303	13,6
15	BIT304	>20
	BIT317	6,02
	BIT308	8,73
	BIT307	1,99
	BIT316	>20
20	BIT310	>20
	BIT301	>20
	BIT315	>20
	BIT319	>20
	BIT305	>20
25	BIT309	>20

Tabla 2a

Ejemplo 13 - Inhibición del VHC usando una combinación de BIT225 con IFN o ribavirina.

Se sometieron a prueba las combinaciones de BIT225/IFN y BIT225/ribavirina frente al virus. Las figuras 2, 3 y 4 muestran que cada fármaco produjo individualmente los siguientes valores de EC₅₀: BIT225, 314nM; rIFNα-2b, 21,7 UI/ml; pero para ribavirina sola, solo se detectó muy poca actividad antivírica en el intervalo de hasta 20 µg/ml.

- 5 Los efectos de las combinaciones de fármacos se calcularon sobre la actividad de cada compuesto cuando se sometió a prueba por sí solo. Se sustrajo la protección antivírica aditiva esperada de la actividad antivírica determinado experimentalmente en cada concentración de combinación resultante en un valor positivo (sinergia), un valor negativo (antagonismo) o cero (aditividad). Se calculó el volumen de sinergia (en unidades de concentración por la concentración el porcentaje, por ejemplo, µM2%, nM2%, nMµM% y similares) en el intervalo de confianza del 95 %. Para estos estudios, la sinergia se definió como combinaciones de fármacos que producen volúmenes de sinergia mayores de 50. La actividad ligeramente sinérgica y la actividad altamente sinérgica se han definido operacionalmente como que producen volúmenes de sinergia de 50-100 y >100, respectivamente. Las interacciones de fármacos aditivos tienen volúmenes de sinergia en el intervalo de -50 a 50, mientras que los volúmenes de sinergia entre -50 y -100 se consideran ligeramente antagonistas y los <-100 son altamente antagonistas.
- 10
- 15 La tabla 3 resume los resultados de los estudios de combinación: BIT225 e IFN tuvieron un volumen de sinergia promedio de 87 UI/mlµM%, lo que indica una ligera sinergia, aunque adviértase que el valor está cerca del valor de corte "altamente sinérgico" y se descubrió que en uno de los tres experimentos la interacción era altamente sinérgica. Curiosamente, la combinación BIT225/ribavirina fue ligeramente antagonista. En estos experimentos, en los que ribavirina por sí misma no tenía actividad antivírica, el resultado indica que la ribavirina antagonizaba la fuerte actividad antivírica de BIT225.
- 20

Aunque hubo un intento en el presente documento de "graduar" el grado de sinergia entre las diferentes combinaciones de compuestos antivíricos, se entenderá que el término "sinergia" también se usa comúnmente en su sentido absoluto y, de ahí, cualquier nivel de sinergia se considera relevante y significativo con respecto a las combinaciones de la presente invención.

Compuestos	Esquema combinación
BIT225 y rIFNα-2b	8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración de prueba alta a 4 µM
BIT225 y ribavirina	8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración de prueba alta a 4 µM
	5 diluciones 2 veces de ribavirina; concentración de prueba alta a 20 µg/ml

25

Eficacia antivírica			Citotoxicidad	
Ensayo	Sinergia/antagonismo	Interpretación	Volumen sinergia/antagonismo (1U/mlnM%)	de Interpretación
BIT225 y rIFNα-2b; 1.º	72/-2 IU/mlµM%	Ligeramente sinérgica	3/-2 IU/mlµM%	Aditivo
BIT225 & rIFNα-2b; 2.º	106/0 IU/mlµM%	Altamente sinérgica	0/-10 IU/mlµM%	Aditivo
BIT225 y rIFNα-2b; 3.º	84/0 IU/mlµM%	Ligeramente sinérgica	0/-9 IU/mlµM%	Aditivo
BIT225 y rIFNα-2b; promedio	87 /-1IU/mlµM%	Ligeramente sinérgica	1/-7 IU/mlµM%	Aditivo
BIT225 y ribavirina; 1.º	4/-62 µg/mlµM%	Ligeramente antagónica	4/-7 µg/mlµM%	Aditivo
BIT225 y ribavirina; 2.º	0/-89	Ligeramente antagónica	0/-6 µg/mlµM%	Aditivo
BIT225 y ribavirina; 3.º	0/-65	Ligeramente antagónica	3/0 µg/mlµM%	Aditivo
BIT225 y ribavirina;	y 1/-72 µg/mlµM%	Ligeramente antagónica	2/-4 µg/mlµM%	Aditivo

promedio**Tabla 3 - Ensayo de combinación de BVDV****Ejemplo 14 - Inhibición del VHC usando una combinación de BIT225, IFN y ribavirina**

Los resultados de los estudios de combinación anteriores revelaron sinergismo entre las actividades antivíricas de BIT225 y IFN α . También es bien conocido de la literatura que aunque la ribavirina tiene muy poca actividad frente a BVDV por sí misma (véase la figura 4), el compuesto potencia la actividad antivírica de IFN α . Curiosamente, a pesar de que notificó un ligero antagonismo entre ribavirina y BIT225 (véase la tabla 3), esto se observó predominantemente a en las concentraciones más altas de ambos fármacos sometidos a prueba.

Se sometió a prueba el efecto de una combinación de BIT225, IFN α y ribavirina. Se eligieron dos concentraciones fijas de sub CE₅₀ de IFN α (5 y 10 IU/ml) y se sometieron a prueba frente a diferentes concentraciones de BIT225 y ribavirina: Se sometieron a prueba 8 diluciones dos veces de BIT225 de una concentración de prueba alta de 4 μ M y 5 diluciones dos veces de ribavirina a partir de una concentración alta de prueba de 20 μ g/ml. Los resultados, presentados en la tabla 4, muestran actividades antivíricas altamente sinérgicas entre BIT225 y ribavirina en ambas concentraciones fijas de IFN α .

<u>Compuestos</u>	<u>Esquema combinación</u>
Concentración fija de rIFN α -2b (5 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-225 y ribavirina	Concentración fija de rIFN α -2b (5 UI/ml); 5 diluciones 2 veces de ribavirina; concentración alta de prueba a 20 μ g/ml; 8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración alta de prueba a 4 μ M
Concentración fija de rIFN α -2b (10 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-225 y ribavirina	Concentración fija de rIFN α -2b (10 UI/ml); 5 diluciones 2 veces de ribavirina; concentración alta de prueba a 20 μ g/ml; 8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración alta de prueba a 4 μ M

<u>Eficacia antivírica</u>			<u>Citotoxicidad</u>		
<u>Ensayo</u>	<u>Sinergia/antagonismo Volumen</u>	<u>Interpretación</u>	<u>Volumen sinergia/antagonismo</u>	<u>Interpretación</u>	
Concentración fija de rIFN α -2b (5 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-225 y ribavirina	138/0 μ g/ml μ M%	Altamente sinérgica	3/-59 μ g/ml μ M%	Ligeramente antagonica	
Concentración fija de rIFN α -2b (10 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-225 y ribavirina	127/0 μ g/ml μ M%	Altamente sinérgica	0/-67 μ g/ml μ M%	Ligeramente antagonica	

Tabla 4

Un análisis más detallado de los datos reveló un 70 % de inhibición de CPE vírico para la combinación de 5 UI/ml de IFN α más la concentración más baja de BIT225 sometido a prueba (31 nM), más la concentración más baja de ribavirina sometida a prueba (1,25 μ g/ml). Las mismas concentraciones bajas de BIT225 y ribavirina, en presencia de 10 IFN α produjeron un 90% de inhibición del virus. Para la comparación, a partir de los estudios anteriores 5 UI/ml de IFN α solo da ~ un 8 % de inhibición; BIT225 31 nM solo da ~ un 5 % de inhibición; y 1,25 μ g/ml de ribavirina sola no muestra actividad antivírica. Claramente la triple combinación es altamente eficaz frente a BVDV.

La figura 5 muestra los niveles de inhibición virus observados con BIT225 31 nM y/o 1,25 μ g de ribavirina en presencia de ausencia de IFN α .

La figura 6 muestra las curvas de respuesta a las dosis completas para BIT225 en presencia de 5 y 10 UI/m de IFN α y muestra el efecto antivírico potenciado mediante adición de 1,25 μ g/ml. El encarte muestra las curvas de respuesta a las dosis completas para ribavirina en presencia de 5 y 10 UI/m de IFN α .

Se determinaron los valores de CE_{50} para BIT225 en presencia de 5 o 10 UI/ml de IFN α como 92 nM (un 95% de CI: 22-385) y 71 nM (un 95 % de CI: 41-1240), respectivamente, mediante ajuste de curva sigmoideal estándar realizado con el software Prism con la Hill slope restringida. El ajuste de curva similar que permite una Hill slope variable produce valores de CE_{50} equivalentes o 149 y 125 nM, de conformidad con los valores determinados en el experimento anterior.

- 5 No fue posible determinar los valores de CE_{50} para los datos de los experimentos en los que se añadió ribavirina porque todas las combinaciones de fármacos sometidas a prueba produjeron > 70 % de inhibición de CPE vírico.

Sumario

Los estudios de combinación con el compuesto BIT225 muestran que:

- BIT225 por sí solo tiene buena actividad antivírica con un valor de EC_{50} de 314 nM (un 95 % de CI: 295-333).
- 10 • BIT225 muestra el sinergismo en combinación con IFN α ; el valor de CE_{50} de BIT225 en presencia de 5 UI/ml de IFN α se reduce a ~ 92 nM (un 95 % de CI: 22 - 385).
- La combinación triple de BIT225, IFN α y ribavirina es altamente sinérgica, produciendo un 70 % de inhibición del CPE del virus tan baja como BIT225 31 nM, 5 UI/ml de IFN α y 1,25 μ g/ml de ribavirina.
- 15 • Se puede lograr la inhibición del virus completa con diversas combinaciones de los tres compuestos: Por ejemplo; 5 IU/ml de IFN α + BIT225 500 nM + 2,5 μ g/ml de ribavirina, o; 10 UI/ml de IFN α + BIT225 31 nM + 2,5 μ g/ml de ribavirina.

Ejemplo 15 - Inhibición del VHC usando una combinación de referencia de BIT225 con nucleósido

Análogos de 2'-C-metiladenosina o 2'-C-metilcitidina.

- 20 Los análogos de nucleósido descritos en el presente documento se pueden sintetizar usando los protocolos descritos en Hecker SJ *et al* (2007) J. Med Chem. 50(16), 3891-6 (for 2'-C-methyladenosine) and Antiviral Research (2007) 73(3), 161-8 (for 2'-C-methylcytidine). Los análogos de nucleósido también se pueden obtener de fuentes comerciales, tales como NANJING BAIFULI TECHNOLOGY CO., LTD.(NAN JING BAI FU LI KE JIYOU XIAN ZE REN GONG SI), RM 701. BLDG 15, High-Tech Zone, Nanjing, 210061, P.R.CHINA.

Tabla 5 - Ensayo de combinación de BVDV

25

Compuestos		Esquema combinación		
BIT225 y de 2'-C-metiladenosina		8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración alta de prueba a 4 μM; 5 diluciones 2 veces de 2'-C-metiladenosina a 10 μM		
BIT225 y 2'-C-metilcitidina		8 diluciones 2 veces de BIT225; concentración alta de prueba a 4 μM; 5 diluciones 2 veces de 2'-C-metilcitidina a 10 μM		
BIT314 y rIFNα-2b		8 diluciones 2 veces de BIT314; concentración alta de prueba a 4 μM; 5 diluciones 2 veces de rIFNα-2b a 5 UI/ml		
Concentración fija de rIFNα-2b (5 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-314 y ribavirina		Concentración fija de BIT-314; 8 diluciones 2 veces de BIT-314; 5 diluciones 2 veces de ribavirina; concentración alta de prueba a 20 μg/ml		
Eficacia antivírica		Citotoxicidad		
Ensayo	Volumen de sinergia/antagonismo	Interpretación	Volumen de sinergia/antagonismo	Interpretación
BIT225 y 2'-C-metiladenosina	106,62/-3,41 μM ² %	Altamente sinérgica	1,91/-53,29 μM ² %	Ligeramente antagónica
BIT225 y 2'-C-metilcitidina	71,23/0 μM ² %	Altamente sinérgica	0/-18,31 μM ² %	aditivo
BIT314 y rIFNα-2b	311,42/-	Altamente sinérgica	0/-1,84 μMIU/ml%	Aditivo

rIFN α -2b	2,11 μ MIU/ml%			
Concentración fija de rIFN α -2b (5 UI/ml) que combina con cantidades variables de BIT-314 y ribavirina	361,68/-12,19 μ M μ g/ml%	Altamente sinérgica	22,65/-0,34 μ M μ g/ml%	Aditivo

La tabla 5 anterior resume los resultados de los estudios de combinación con el compuesto BIT225 y análogos de nucleósido, y combinaciones del compuesto BIT314 con IFN y/o ribavirina.

- Como se muestra en el presente documento, las combinaciones de BIT225/2'-C-metiladenosina y BIT225/2'-C-metilcitidina se sometieron a prueba frente al virus. La figura 7 muestra que cada análogo de nucleósido era activo individualmente con los siguientes valores de CE₅₀: CE₅₀ de 2'-C-metiladenosina = 2,16 M (un 95 % de CI: 1,54 a 3,03 μ M)); CE₅₀ de 2'-C-metilcitidina = 2,75 μ M (un 95 % de CI: 0,86 a 8,7 μ M).

- Como antes, los efectos de las combinaciones de fármacos se calcularon sobre la actividad de cada compuesto cuando se sometió a prueba por sí solo. Se sustrajo la protección antivírica aditiva esperada de la actividad antivírica determinado experimentalmente en cada concentración de combinación resultante en un valor positivo (sinergia), un valor negativo (antagonismo) o cero (aditividad). Se calculó el volumen de sinergia (en unidades de concentración por la concentración el porcentaje, por ejemplo, μ M²%, nM²%, nM μ M% y similares) en el intervalo de confianza del 95 %. Para estos estudios, la sinergia se definió como combinaciones de fármacos que producen volúmenes de sinergia mayores de 50. La actividad ligeramente sinérgica y la actividad altamente sinérgica se han definido operacionalmente como que producen volúmenes de sinergia de 50-100 y >100, respectivamente. Las interacciones de fármacos aditivos tienen volúmenes de sinergia en el Intervalo de -50 a 50, mientras que los volúmenes de sinergia entre -50 y -100 se consideran ligeramente antagonistas y los <-100 son altamente antagonistas.

La tabla 5 resume los resultados de los estudios de combinación: BIT225 y 2'-C-metiladenosina tenían un volumen de sinergia promedio de 106 μ M % lo que indica sinergia "alta". BIT225 y 2'-C-metilcitidina tenían un volumen de sinergia promedio de 71 μ M²% lo que indica "ligera" sinergia.

- las figuras 8 y 9 muestran los cambios con respecto a las curvas de respuesta a la dosis para BIT225 en presencia de diversas concentraciones de 2'-C-metiladenosina o 2'-C-metilcitidina, respectivamente.

Ejemplo 16 - Inhibición del VHC usando una combinación de BIT314 con IFN.

- Se sometieron a prueba las combinaciones de BIT314/IFN frente al virus. Dos experimentos anteriores con BIT314 sometidos a prueba individualmente frente a BVDV produjeron valores de CE₅₀ de 210 nM y 390 nM (promedio = 300 nM). Del mismo modo, se ha determinado previamente un valor de EC₅₀ de 21,7 UI/ml para rIFN α -2b. La figura 10 incluye la curva de respuesta a la dosis para BIT314 como se determina en un tercer experimento, que fue parte de estos estudios de combinación. En ese experimento, la CE₅₀ para BIT314 fue 540 nM.

- Como previamente, se calcularon los efectos de las combinaciones de fármacos sobre la actividad de cada compuesto cuando se sometió a prueba solo como se describe en el ejemplo 15. La tabla 5 resume los resultados de los estudios de combinación: BIT314 e IFN tuvieron un volumen de sinergia promedio de 311 μ MUI /ml% lo que indica "alta" sinergia.

Ejemplo 17 - Inhibición del VHC usando combinaciones triples de BIT314, IFN y ribavirina

Los resultados de los estudios de combinación anteriores revelaron sinergismo entre las actividades antivíricas de BIT314 y IFN α . También es bien conocido de la literatura que aunque la ribavirina tiene muy poca actividad frente a BVDV por sí misma (véase la figura 4), el compuesto potencia la actividad antivírica de IFN α .

- Se sometió a prueba el efecto de una combinación de BIT314, IFN α y ribavirina. Se eligió una única sub EC₅₀ fija de IFN α (5 UI/ml) y se sometió a prueba frente a concentraciones variables de BIT314 y ribavirina: Se sometieron a prueba 8 diluciones dos veces de BIT314 de una concentración alta de prueba de 4 μ M y 5 diluciones dos veces de ribavirina de una concentración alta de prueba de 20 μ l/ml. Los resultados, resumidos en la tabla X, muestran actividades antivíricas altamente sinérgicas entre BIT314 y ribavirina en presencia de IFN α : volumen de sinergia/antagonismo de 361 μ M μ g/ml%. 4

- La figura 10 muestra las curvas de respuesta a las dosis completas para BIT314 en presencia de y diversas concentraciones de rIFN α -2b y la figura 11 ilustra el efecto antivírico potenciado mediante adición de 5 IU/ml de IFN α + 1,25 μ g/ml de ribavirina y 5 UI/ml de IFN α + 2,5 μ g/ml de ribavirina. El valor de EC₅₀ para BIT314 solo, en este experimento, fue de 540 nM (un 95 % de CI: 389 a 739 nM) y; en presencia de 5 UI/ml de IFN α más 1,25 μ g/ml de ribavirina fue de 183 nM (un 95% de CI: 148 a 226 nM), como se determina mediante ajuste de curva sigmoideal estándar realizado con el software Prism.

Sumario

Los estudios de combinación con el compuesto BIT314 muestran que:

- BIT314 solo tiene buena actividad antivírica con un valor de CE_{50} de 380 nM (95,4 EEM, $n = 3$)).
- BIT314 muestra sinergismo en combinación con IFN α ; el valor de EC_{50} de BIT314 en presencia de 40 UI/ml IFN α disminuye a aproximadamente 60 nM.
- La combinación triple de BIT314, IFN α y ribavirina es altamente sinérgica, produciendo un 70 % de inhibición de CPE del virus tan baja como BIT314 62 nM, 5 UI/ml de IFN α y 2,5 μ g/ml de ribavirina.
- Se puede lograr la inhibición del virus completa con diversas combinaciones de los tres compuestos: Por ejemplo; 5 UI/ml de IFN α + BIT314 250 nM + 2,5 μ g/ml de ribavirina, o; 5 UI/ml de IFN α + BIT314 500 nM + 1,25 μ g/ml de ribavirina.

Referencias

- VanCott TC, Mascola JR, Loomis-Price LD, Sinangil F, Zitomersky N, McNeil J, Robb ML, Birx DL, Barnett S. (1999) *J. Virol.* 73(6):4640-50 Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J and
- De Clercq E. (1988) *J. Virolog. Methods.* 20:309-321 D'Cruz OJ, Shih M-J, Yiv SH, Chen C-L, Uckun FM. (1999) *Mol. Hum. Reprod.* 5(5):421-432 Joo, Hong-Gu. (2003) *J. Vet. Sci.* 4(3):229-234 Ewart, G.D., T. Sutherland, P.W. Gage, and G.B. Cox, *The Vpuprotein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels.* *J Virol*, 1996. 70(10): p. 7108-15.
- Ewart, G.D., K. Mills, G.B. Cox, and P.W. Gage, *Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu.* *Eur Biophys J*, 2002. 31(1): p. 26-35.
- Ewart, G.D., N. Nasr, H. Naif, G.B. Cox, A.L. Cunningham, and P.W. Gage, *Potential new anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds depress virus replication in cultured human macrophages.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(6): p. 2325-30.
- Gage, P., G. Ewart, J. Melton, and A. Premkumar, *Virus Ion Channels Formed by Vpu of HIV-1, the 6K Protein of Alphaviruses and NB of Influenza B Virus.*, in *Viral Membrane Proteins: Structure, Function and Drug Design*, W. Fischer, Editor. 2005, Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York. p. Chapter 15.
- Melton, J.V., G.D. Ewart, R.C. Weir, P.G. Board, E. Lee, and P.W. Gage, *Alphavirus 6K proteins form ion channels.* *J Biol Chem*, 2002. 277(49): p. 46923-31. Premkumar, A., X. Dong, G. Haqshenas, P.W. Gage, and E.J. Gowans, *Amantadine inhibits the function of an ion channel encoded by GB virus B, but fails to inhibit virus replication.* *Antivir Ther*, 2006. 11(3): p. 289-95.
- Premkumar, A., C.R. Horan, and P.W. Gage, *Dengue virus M protein C-terminal peptide (DVM-C) forms ion channels.* *J Membr Biol*, 2005. 204(1): p. 33-8.
- Premkumar, A., L. Wilson, G.D. Ewart, and P.W. Gage, *Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride.* *FEBS Lett*, 2004. 557(1-3): p. 99-103.
- Wilson, L., P. Gage, and G. Ewart, *Validation of coronavirus E proteins ion channels as targets for antiviral drugs.* *Adv Exp Med Biol*, 2006. 581: p. 573-8. Wilson, L., P. Gage, and G. Ewart, *Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication.* *Virology*, 2006. 353(2): p. 294-306. Wilson, L., C. McKinlay, P. Gage, and G. Ewart, *SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels.* *Virology*, 2004. 330(1): p. 322-31. Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh, *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. 100(20): p. 11646-51.
- Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands, *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine.* *FEBS Lett*, 2003. 535(1-3): p. 34-8.
- Pavlovic, D., D.C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann, *The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 6104-8.
- Hay, A.J., A.J. Wolstenholme, J.J. Skehel, and M.H. Smith, *The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine.* *Embo J*, 1985. 4(11): p. 3021-4. Duff, K.C. and R.H. Ashley, *The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers.* *Virology*, 1992. 190(1): p. 485-9.
- De Clercq, E., *Antiviral agents active against influenza A viruses.* *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(12): p. 1015-25.

- Miller, C, *Ion channel reconstitution*. 1986, New York and London: Plenum Press. Buckwold, V.E., B.E. Beer, and R.O. Donis, *Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents*. *Antiviral Res*, 2003. 60(1): p. 1-15.
- 5 Harada, T., N. Tautz, and H.J. Thiel, *E2-p7 región of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies*. *J Virol*, 2000. 74(20): p. 9498-506.
- Griffin, S., D. Clarke, C. McCormick, D. Rowlands, and M. Harris, *Signalpeptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes*. *J Virol*, 2005. 79(24): p. 15525-36. Buckwold, V.E., J. Wei, M. Wenzel-Mathers, and J. Russell, *Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and Ribavirin against bovine viral diarrhea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. 47(7): p. 2293-8.
- 10 Haqshenas, G., X. Dong, G. Ewart, S. Bowden, and E.J. Gowans, *A 2a/1b full-length p7 inter-genotypic chimeric genome of hepatitis C virus is infectious in vitro*. *Virology*, 2007. 360(1): p. 17-26.
- Buckwold, V.E., J. Wei, M. Wenzel-Mathers, and J. Russell. 2003. Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and Ribavirin against bovine viral diarrhea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47:2293-2298.
- 15 Buckwold, V.E., B.E. Beer, and R.O. Donis. 2003. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res*. 60:1-15.

REIVINDICACIONES

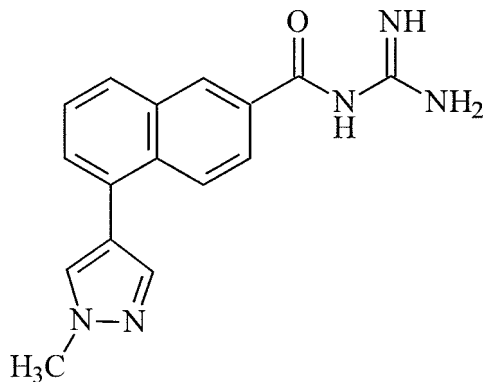
1. Una composición que comprende:

(A) 5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina o (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y

5 (B) IFN α -2b,

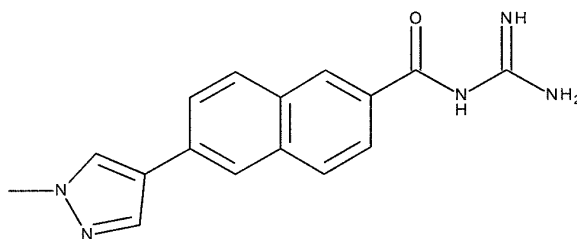
en la que:

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



BIT-225, y

(6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina tiene la estructura



BIT-314.

10

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el grupo amina o imina de la porción de guanidilo de 5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina o (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina está presente como la base libre, un hidrato, una sal orgánica o inorgánica o una combinación de los mismos.

15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición comprende adicionalmente ribavirina.

4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición comprende:

5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina y IFN α -2b;
5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina y IFN α -2b y ribavirina;
(6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina y IFN α -2b; o
20 (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina y IFN α -2b y ribavirina.

20

5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del VHC, que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

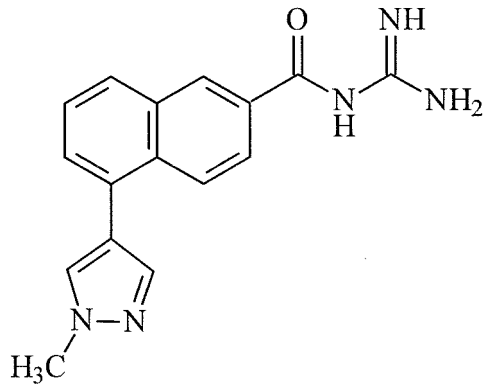
6. Una composición que comprende:

25 (A) 5-(1-metilpirazol-4-il)2-naftoilguanidina o (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y

(B) IFN α -2b,

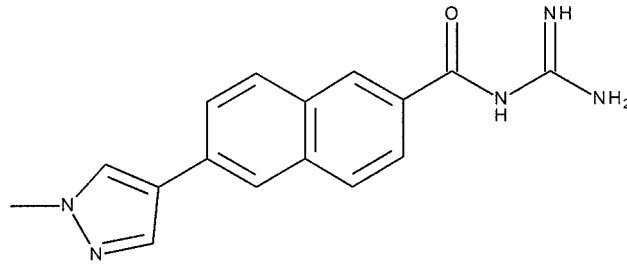
para su uso en el tratamiento de la infección por VHC como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial, en cualquier orden, en la que:

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



BIT-225, y

5 (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina tiene la estructura



BIT-314.

7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición comprende adicionalmente ribavirina.

10 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la composición comprende:

5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina y IFN α -2b;
 5-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoilguanidina y IFN α -2b y ribavirina;
 (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina y IFN α -2b; o
 (6-(1-metilpirazol-4-il)-2-naftoil)guanidina y IFN α -2b y ribavirina.

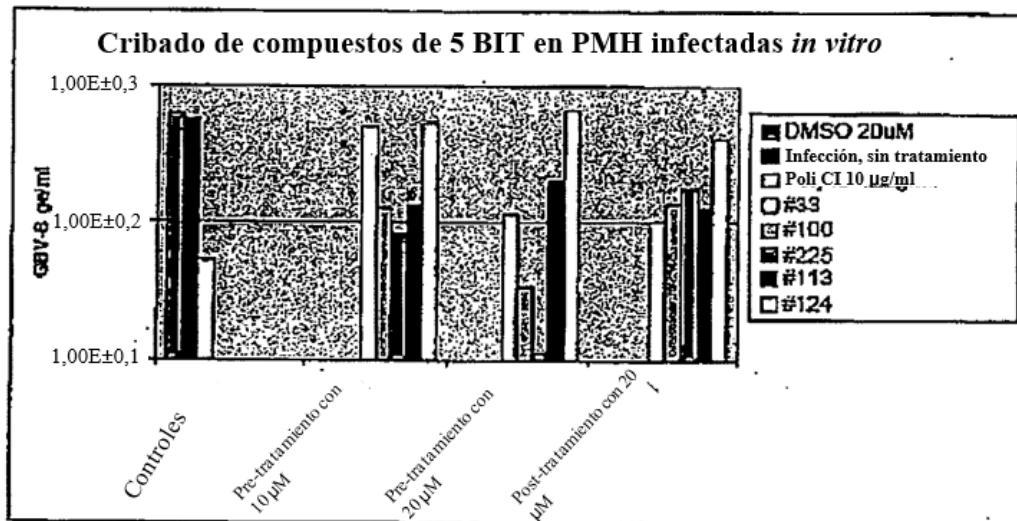


Figura 1

**Curva de respuesta a
dosis**

**BIT225 frente a
BVDV**

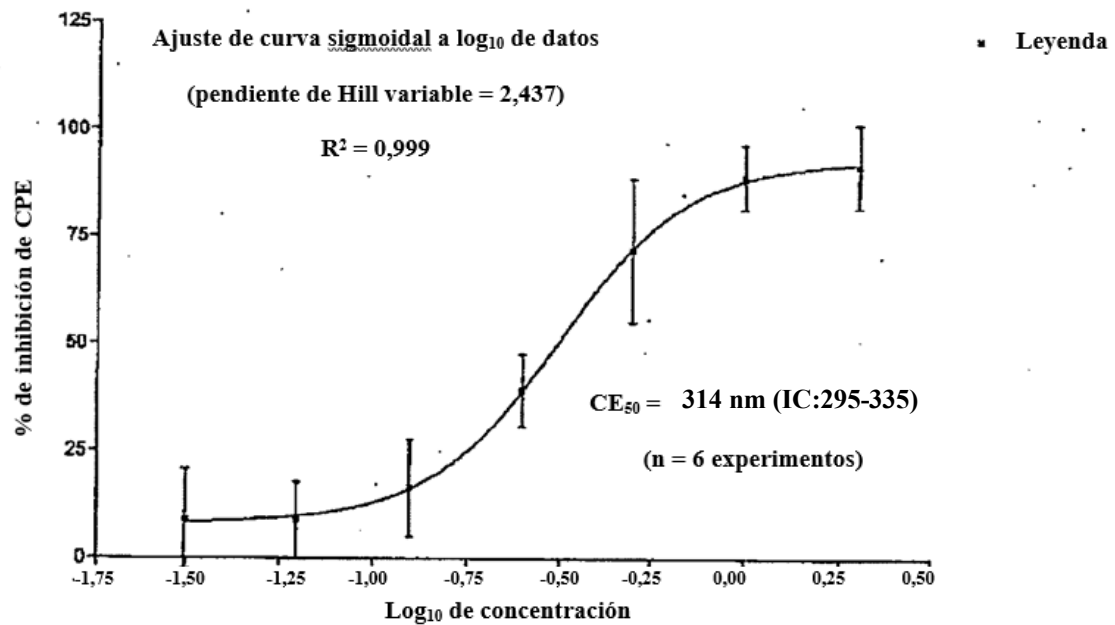


Figura 2

Curva de respuesta a dosis

IFN frente a BVDV

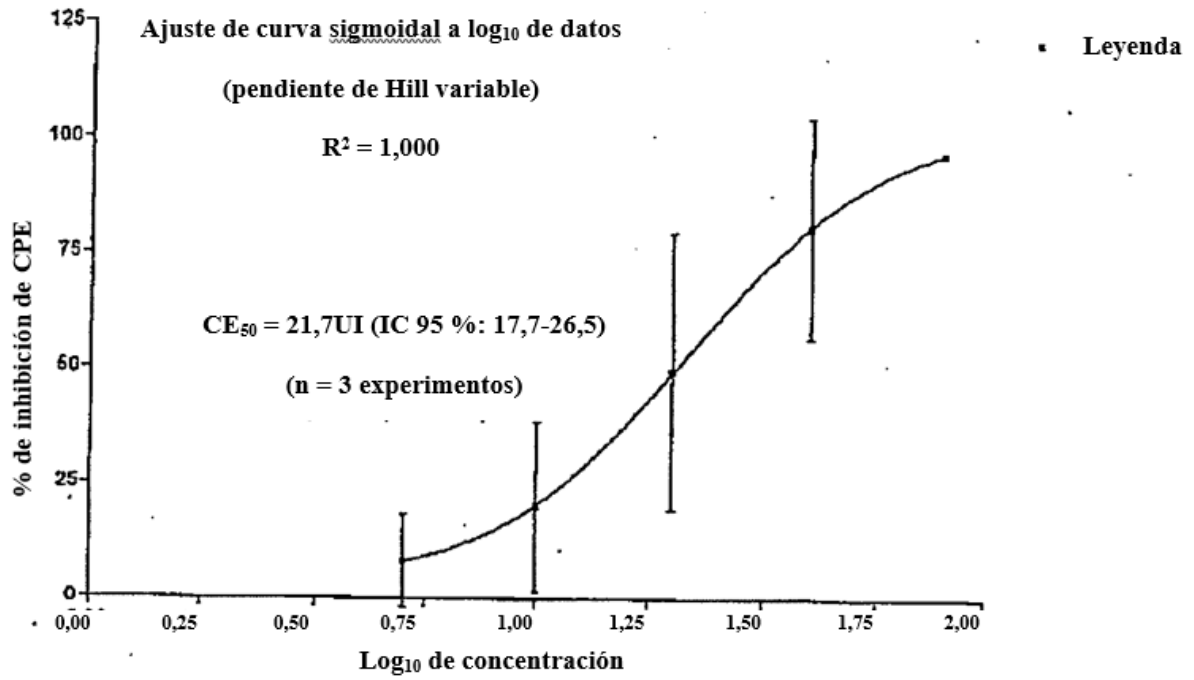


Figura 3

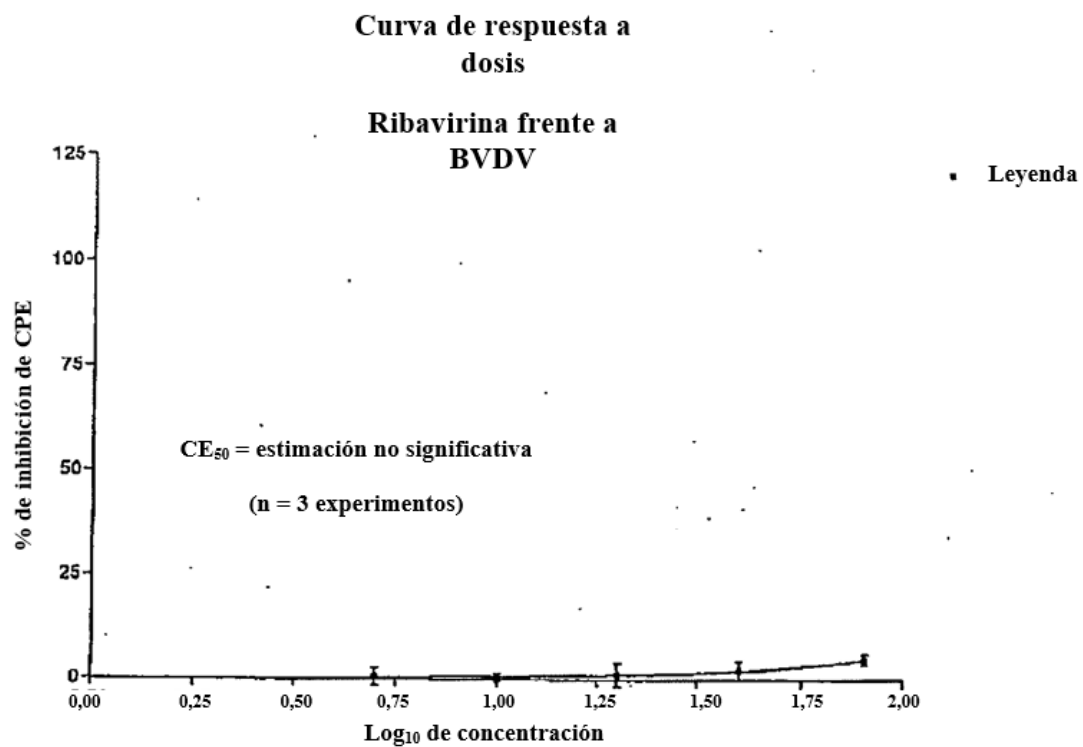


Figura 4

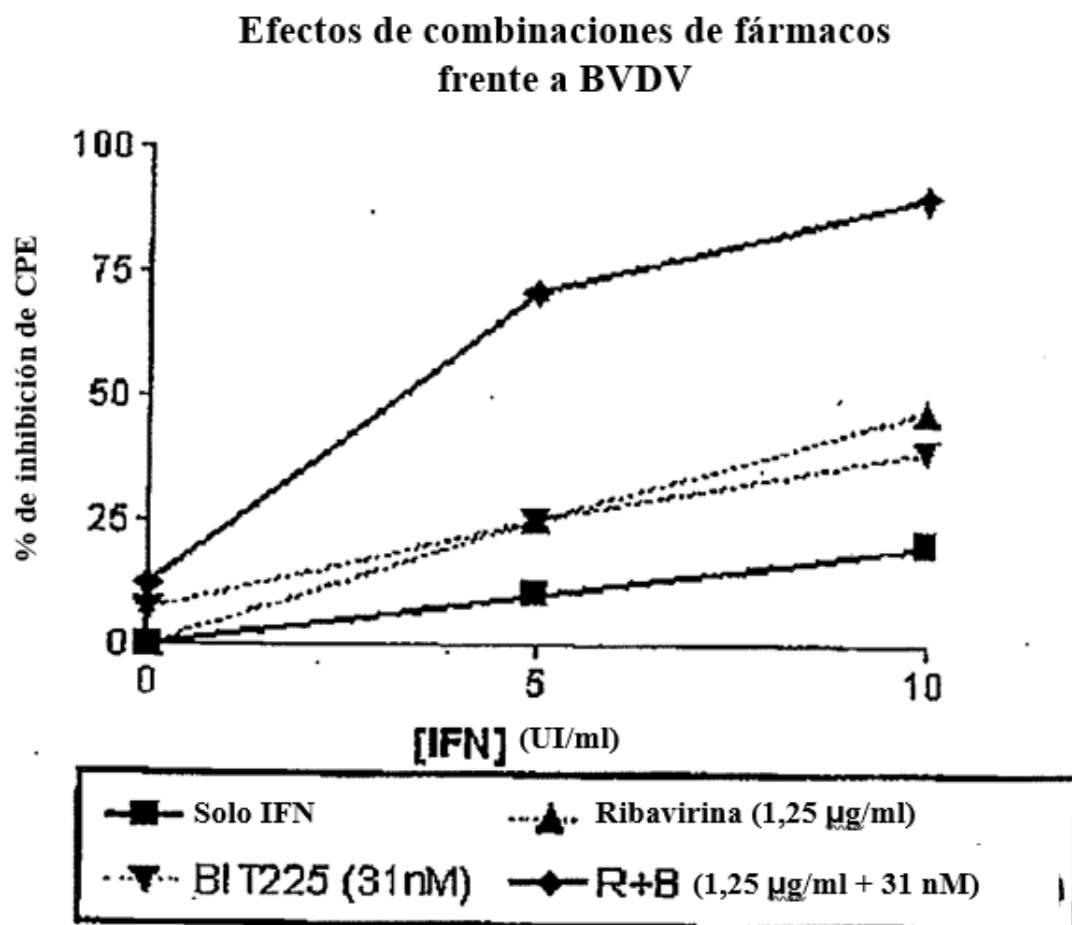


Figura 5

Curvas de respuesta a dosis de BIT225 frente a BVDV

En presencia de 10 o 5 UI/ml de IFN;

Efecto de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de Ribavirina

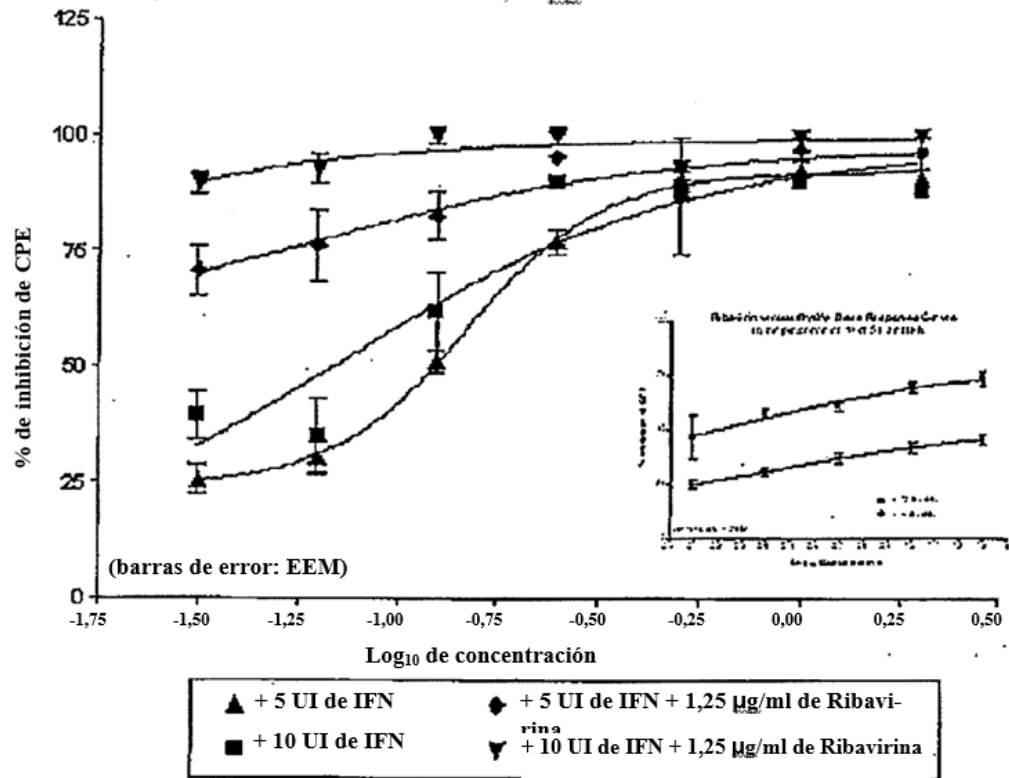


Figura 6

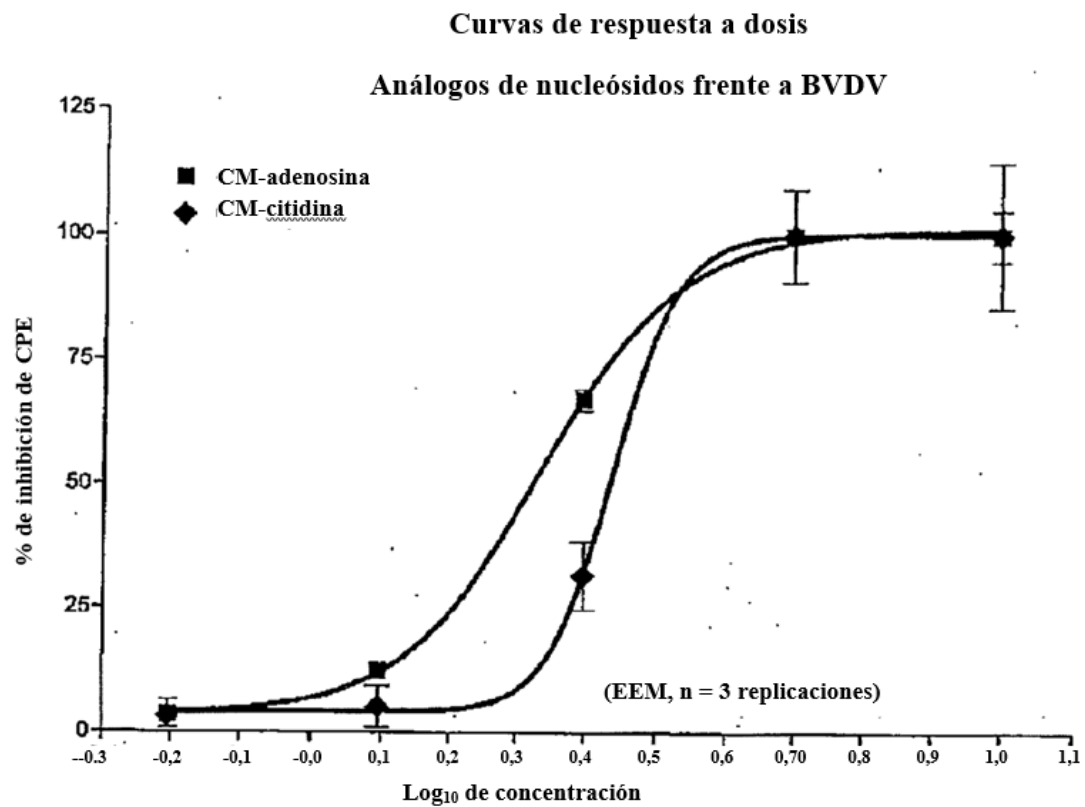


Figura 7

Curvas de respuesta a dosis

BIT225 más 2'-C-metiladenosina (CMA) frente a BVDV

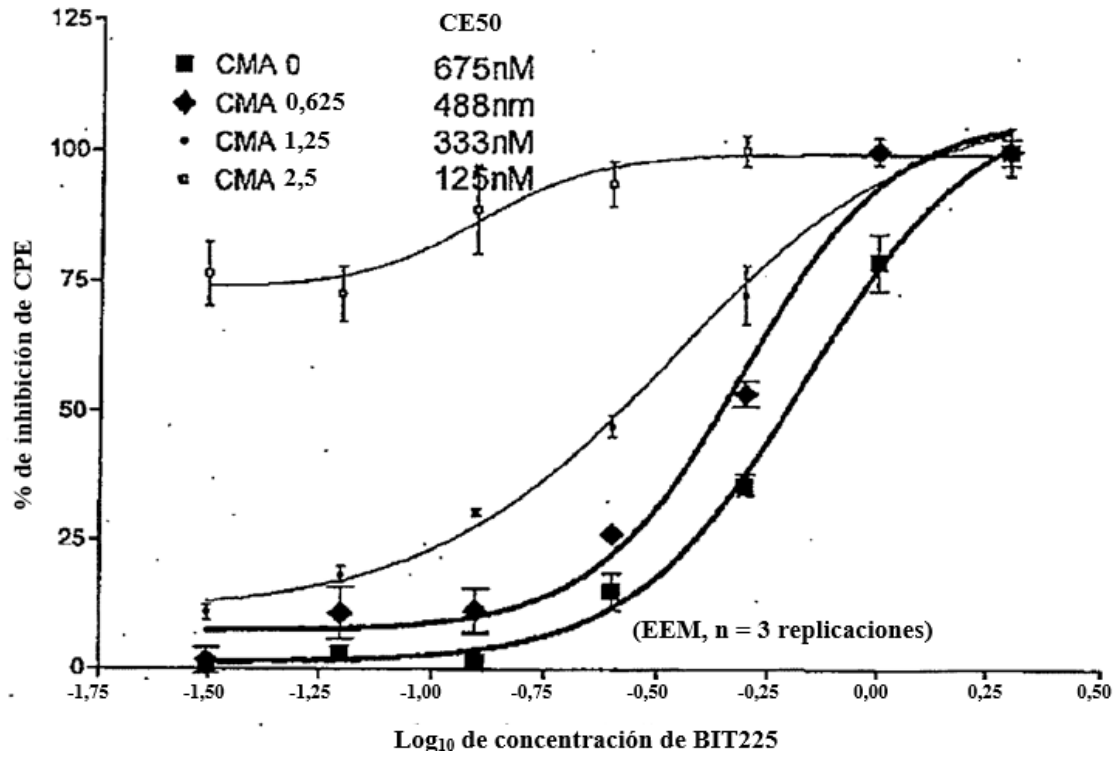


Figura 8

Curvas de respuesta a dosis

BIT225 más 2'-C-metilcitodina (CMC) frente a BVDV

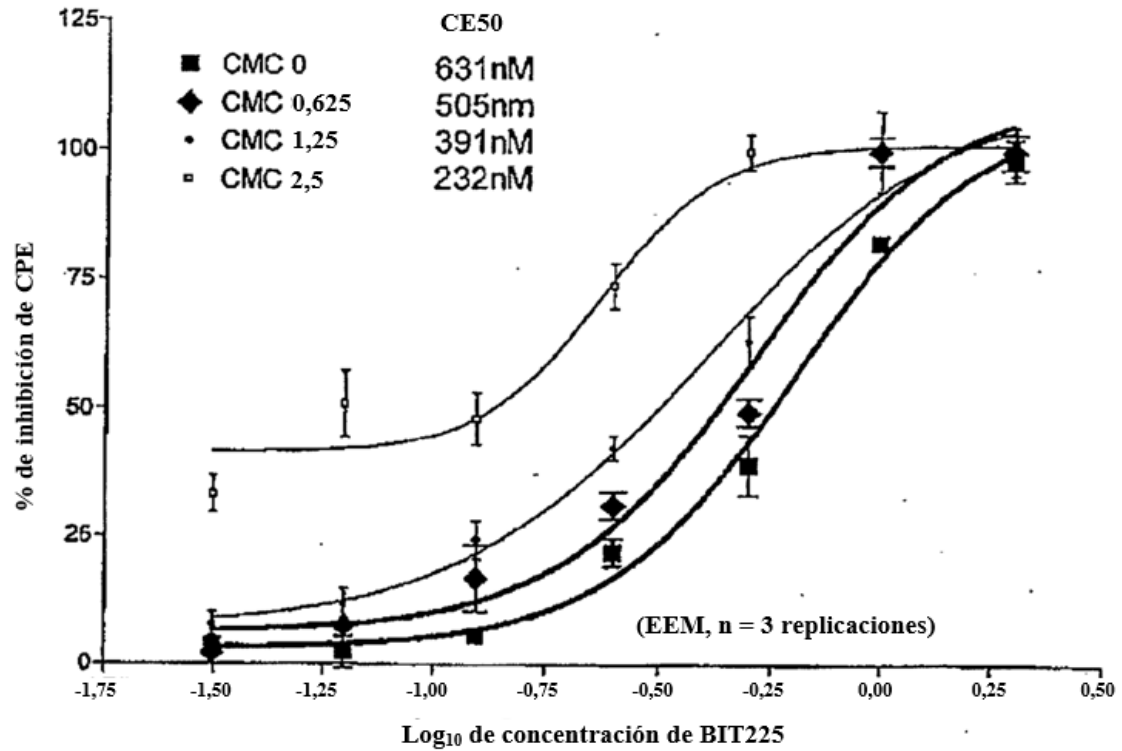


Figura 9

Curvas de respuesta a dosis

BIT314 más IFN (CMC) frente a BVDV

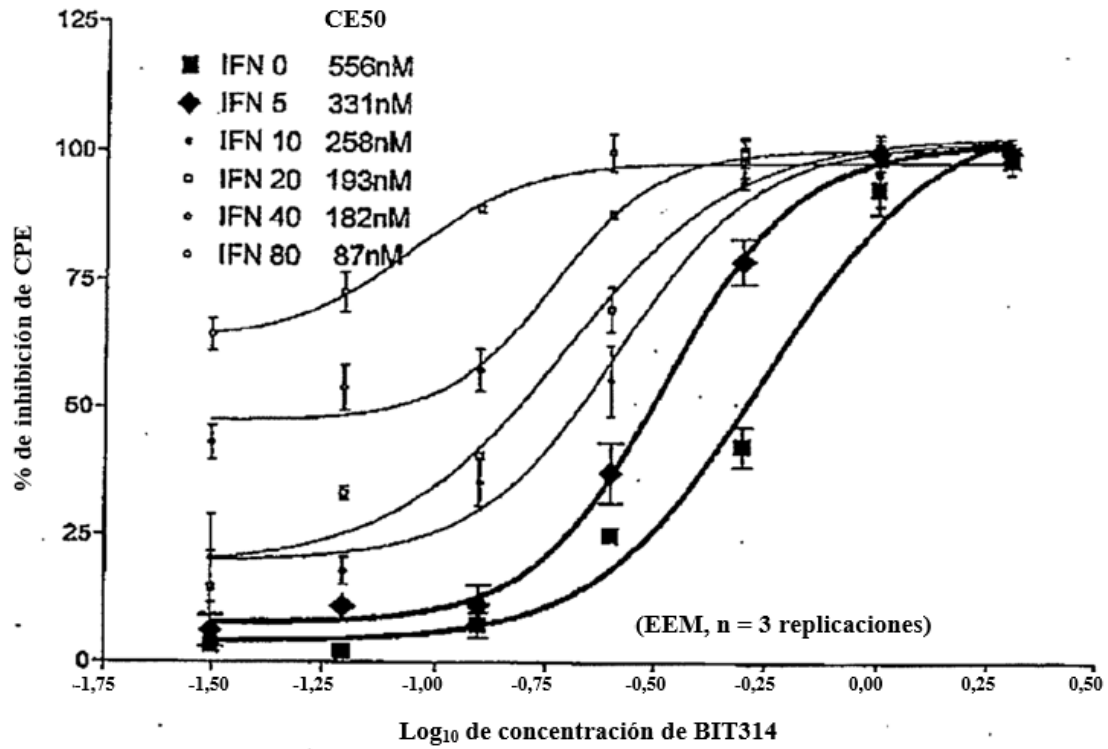


Figura 10

Curvas de respuesta a dosis

(BIT314 + 5 UI/ml de IFN) + 1,25 o 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Ribavirina frente a BVDV

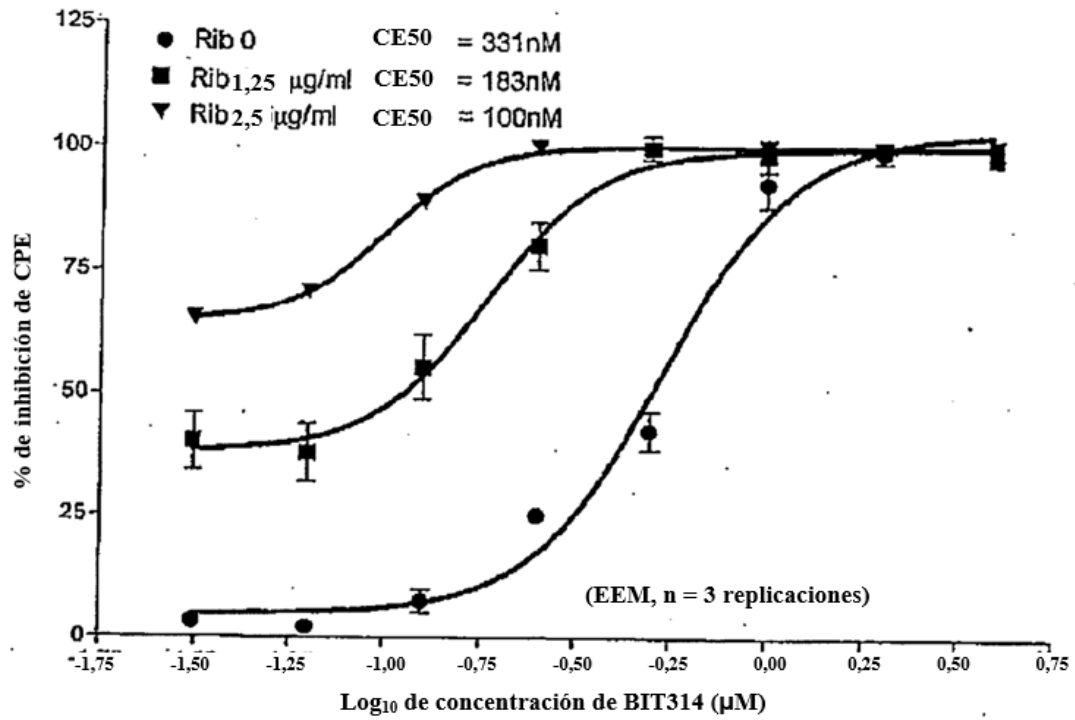


Figura 11