

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 396**

51 Int. Cl.:

A61P 31/12	(2006.01)	C07D 295/14	(2006.01)
A61K 31/496	(2006.01)	C07D 215/48	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)	C07D 235/18	(2006.01)
A61K 31/454	(2006.01)	C07D 333/38	(2006.01)
A61K 31/4709	(2006.01)	C07D 209/18	(2006.01)
A61K 31/445	(2006.01)	C07D 231/10	(2006.01)
A61K 31/4525	(2006.01)	C07D 213/56	(2006.01)
A61K 31/4535	(2006.01)		
C07D 401/06	(2006.01)		
C07D 487/04	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/US2013/057585**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14036443**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13833135 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2922596**

54 Título: **Heterociclil carboxamidas para tratar enfermedades víricas**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201261695869 P
13.03.2013 US 201361779595 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2018

73 Titular/es:

NOVADRUG, LLC (100.0%)
2201 West Campbell Park Drive Suite 215
Chicago, Illinois 60612, US

72 Inventor/es:

HUBERMAN, ELIEZER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 684 396 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Heterociclicil carboxamidas para tratar enfermedades víricas

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de prioridad según el Título 35 del Código de los Estados Unidos, artículo 119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 61/695869, presentada el 31 de agosto de 2012, y la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 61/779595, presentada el 13 de marzo de 2013.

10

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII mediante EFS-Web. Dicha copia en ASCII, creada el 29 de agosto de 2013, se denomina 701867_SEQ_ST25.txt. y tiene un tamaño 4.573 bytes.

15

Campo técnico

La invención descrita en el presente documento se refiere a piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas y a los métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades víricas. Las enfermedades víricas incluyen infecciones por el virus de la hepatitis C, VIH, BVDV, y Coronavirus.

20

Antecedentes y sumario

Hepatitis C (VHC) pertenece a la familia Flaviviridae de virus de ARN monocatenarios de sentido positivo. El genoma de VHC codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 restos de aminoácidos, que se procesa en proteínas estructurales y no estructurales. La infección por VHC es un problema de salud global significativo; la Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 170 millones de personas transportan la infección por VHC, que puede dar como resultado en última instancia hepatitis crónica, cirrosis, y carcinoma hepatocelular. Se ha notificado que dichas complicaciones son responsables de aproximadamente 10.000-20.000 muertes anualmente solo en los Estados Unidos, y que el VHC es la causa que conduce a la enfermedad hepática avanzada y la causa subyacente que conduce al trasplante de hígado. Las terapias actuales para la infección por VHC se basan en la combinación de interferón- α (IFN) y ribavirina. Se ha notificado que este régimen de tratamiento produce efectos secundarios indeseables tales como leucopenia, trombocitopenia, y anemia hemolítica, con la desventaja añadida de que solo aproximadamente un 50 % de los pacientes consigue una respuesta al virus sostenida. Recientemente, nuevos fármacos inhibidores de proteasas, concretamente telaprevir de Vertex y boceprevir de Merck, se añadieron a la combinación de ribavirina e IFN, para los que se ha descubierto que cada uno de ellos acorta el tiempo de tratamiento y aumenta significativamente el porcentaje de pacientes que consiguen una respuesta al virus sostenida. Sin embargo, el problema de toxicidad de ribavirina e IFN sigue siendo un grave contratiempo. (véase, por ejemplo, Hanazaki, Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents 2003, 2, 103; Lauer y Walker, N. Engl. J. Med. 2001,345, 41; Gordon y Keller, J. Med. Chem. 2005, 48, 1; Tan et al., Nat. Rev. Drug Discovery 2002, 1,867; Idno y Bellobuono, Curr. Pharm. Des. 2002, 8, 959; Di Bisceglie et al., Hepatology 2002, 35, 224; Samuel, Clin. Microbiol. Rev. 2001, 14, 778; Klibanov et al., 2011, Pharmacotherapy 31,951; Kwo y Zhao 2011, Clin Liver Dis. 15, 537). Por lo tanto, son muy necesarios agentes terapéuticos dirigidos contra VHC más eficaces y menos tóxicos.

30

35

40

45

Otro miembro de la familia Flaviviridae de virus de ARN monocatenarios de sentido positivo es el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV). La infección con este virus provoca una enfermedad mucosal grave en ganado y otros rumiantes así como en cerdos. Las infecciones de ganado con BVDV están marcadas por ulceraciones de la mucosa de la nariz, boca y gastrointestinal, que producen una salivación, secreción nasal, tos y/o diarrea continuas. Como resultado, se trata de un virus que se disemina rápidamente entre los animales. El virus también ocasiona que los terneros que nacen, queden persistentemente infectados, o padezcan un grave retraso y/o presenten graves malformaciones neurológicas. El impacto económico del BVDV es considerable, aunque es difícil estimar de forma precisa su nivel debido a que determinadas infecciones permanecen sin diagnosticar o las pérdidas no se reconocen como debidas al virus. (véase, por ejemplo, Buckwold et al., Antivirus Research 2003, 60, 1; Finkielstein et al., 2010, Current Medicinal Chemistry 17, 2933). Otros miembros de esta familia Flaviviridae de enfermedades incluyen el virus del Nilo occidental y la fiebre del dengue. Por tanto, los agentes terapéuticos eficaces serán útiles para reducir el impacto económico de BVDV, el virus del Nilo occidental y la fiebre del dengue.

50

55

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1) es una enfermedad provocada por un retrovirus denominado virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), que pertenece a las familias Retroviridae y Lentivirus. Esta dolencia produce un declive gradual del sistema inmunitario y deja a los individuos infectados con VIH susceptibles a infecciones oportunistas y a la formación de tumores que conducen eventualmente a la muerte. Para aliviar estas enfermedades devastadoras, la comunidad farmacéutica concibió una terapia antirretrovírica activa. Esta implica un cóctel de fármacos inhibidores de la proteasa y transcriptasa inversa de VIH. Esta terapia provoca una mejora significativa en la salud y calidad de vida generales de muchos individuos infectados con VIH. Esta recuperación está también asociada con una marcada reducción en la morbilidad y mortalidad asociadas con VIH. Sin embargo, el

60

65

cóctel de fármacos inhibidor de la proteasa y transcriptasa inversa de VIH no cura al paciente de la infección por VIH ni evita el regreso del SIDA, una vez que el tratamiento se ha terminado. Por lo tanto, los pacientes que se retiran de la terapia no se benefician del tratamiento. Además, para una fracción considerable de pacientes con SIDA, este tratamiento consigue resultados mucho menos que óptimos debido a la intolerancia de la terapia, los efectos secundarios de la terapia o la infección con una cepa de VIH resistente al fármaco. Para superar estas limitaciones, existe una necesidad de fármacos anti-VIH eficaces adicionales, y en particular, fármacos anti-VIH que sean menos tóxicos. (véase, por ejemplo, Sepkowitz 2001, N. Engl. J. Med. 344, 1764; Weiss 1993, Science 260, 1273; Dybul et al. 2002, Ann. Intern. Med. 137, 381; Martínez-Picado et al. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 10948.

Otra familia de virus de ARN son los coronavirus, que son especies de virus que pertenecen a la subfamilia Coronavirinae de la familia Coronaviridae. Los coronavirus son virus con envoltura que tienen un genoma de ARN de sentido positivo y una nucleocápsida de simetría helicoidal. Los coronavirus infectan principalmente el tracto respiratorio superior y el tracto gastrointestinal de mamíferos y pájaros. Cuatro de las cinco diferentes cepas de coronavirus conocidas actualmente infectan seres humanos. Una de las cepas mejor conocidas de coronavirus humanos es SARS-CoV, que produce síndrome respiratorio agudo grave (SARS). Se han notificado también coronavirus que producen un porcentaje significativo de todos los resfriados comunes en seres humanos. Se han notificado también coronavirus que producen neumonía, tanto neumonía vírica directa como una neumonía bacteriana secundaria. Recientemente, se ha notificado en seres humanos el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente medio (MERS-CoV), un coronavirus análogo al SARS. Los coronavirus infectan también ganado, tal como pollos. El virus de la bronquitis infecciosa (VBI) es un coronavirus que se dirige no solo al tracto respiratorio, sino también al tracto urogenital en pollos. El virus puede también diseminarse a diferentes órganos a través del pollo.

Se informa de que los coronavirus causan varias enfermedades en animales de granja y mascotas domesticadas, incluyendo coronavirus porcino (coronavirus de la gastroenteritis transmisible, TGE), coronavirus bovino, cada uno de los cuales da como resultado diarrea en animales jóvenes, coronavirus felino, tal como coronavirus entérico felino, de significancia clínica menor, y peritonitis infecciosa felina (FIP), una enfermedad asociada con alta mortalidad, coronavirus canino (CCoV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y otros. Por lo tanto, son necesarios compuestos, composiciones y terapias para tratar los coronavirus.

El documento WO 2011/091152 A1 divulga piperazina carboxamidas para el tratamiento de la hepatitis C. Los documentos WO 2011/060396 A1, WO 2011/060026 A1, WO 2006/074025 A1, y Duffy et al. (Bioorgan. Med. Chem. Letters 2002, 12:2423-2426) divulgan piperazina carboxamidas para el tratamiento del VIH. WO 2009/010480 A1, WO 02/43734 A1, y Dessalew (QSAR & Comb. Sci. 2008, 27(7):901-912) divulgan piperidina carboxamidas para el tratamiento del VIH. El documento WO 99/42455 A1 divulga piperidina carboxamidas para el tratamiento de infecciones víricas. El documento EP 2142706 A2 divulga una piperazina carboxamida para el tratamiento de infecciones víricas. El documento WO 2006/013012 A2 divulga piperazina carboxamidas para el tratamiento de la fibrosis hepática. El documento WO 2010/141738 A2 divulga piperidina carboxamidas para el tratamiento del cáncer.

Se ha descubierto en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas, incluyendo los compuestos descritos en el presente documento, son agentes antivíricos activos. En particular, se ha descubierto en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-VIH activos. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-VHC activos. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son activas frente a virus de la familia Flaviviridae y enfermedades relacionadas. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-BVDV activos. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-virus del Nilo occidental activos. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-Dengue activos. Se ha descubierto también en el presente documento que las piperidina y piperazina carboxamidas son agentes anti-coronavirus activos.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En una realización ilustrativa, se describen en el presente documento piperidina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de infecciones por VIH, SIDA y enfermedades relacionadas con SIDA. En otra realización, se describen en presente documento composiciones farmacéuticas que comprende las piperidina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de infecciones por VIH, SIDA y enfermedades relacionadas con SIDA. De manera ilustrativa, las composiciones incluyen uno o más soportes, diluyentes, o excipientes, o una combinación de los mismos.

En otra realización, se describen en el presente documento métodos para tratar infecciones por VIH, SIDA, y enfermedades relacionadas con SIDA, donde los métodos incluyen administrar las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas. En otra realización, se describe en el presente documento el uso de una o más de las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente o animal hospedador que tiene una infección por VIH, SIDA y enfermedades relacionadas con SIDA.

En otra realización ilustrativa, se describen en el presente documento piperidina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de infecciones por BVDV. En otra realización, se describen en el presente documento composiciones ilustrativas que comprenden las piperidina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de infecciones por BVDV. De manera ilustrativa, las composiciones incluyen uno o más soportes, diluyentes, o excipientes, o una combinación de los mismos.

En otra realización, se describen en el presente documento métodos para tratar las infecciones por BVDV, donde los métodos incluyen administrar las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas. En otra realización, se describe en el presente documento el uso de una o más de las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente u hospedador animal que tiene una infección por BVDV.

En otra realización ilustrativa, se describen en el presente documento piperidinas carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento del VHC. En otra realización, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden las piperidina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento del VHC. De manera ilustrativa, las composiciones incluyen uno o más soportes, diluyentes, o excipientes, o una combinación de los mismos.

En otra realización, se describen en el presente documento métodos para tratar el VHC, donde los métodos incluyen administrar las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas. En otra realización, se describe en el presente documento el uso de una o más de las piperidina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina carboxamidas sustituidas en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente u hospedador animal que tiene una infección por VHC.

En otra realización ilustrativa, se describen en el presente documento piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de una infección por coronavirus, tal como una infección por SARS-CoV y MERS-CoV. En otra realización, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas que son útiles para el tratamiento de una infección por coronavirus, tal como una infección por SARS-CoV y MERS-CoV. De manera ilustrativa, las composiciones incluyen uno o más soportes, diluyentes, o excipientes, o una combinación de los mismos.

En otra realización, se describen en el presente documento métodos para tratar una infección por coronavirus, tal como una infección por SARS-CoV y MERS-CoV, donde los métodos incluyen administrar las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas. En otra realización, se describe en el presente documento el uso de una o más de ñas piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas y/o las composiciones farmacéuticas que incluyen las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente u animal hospedador que tiene una infección por coronavirus, tal como una infección por SARS-CoV o MERS-CoV.

En una realización ilustrativa, se describen en el presente documento piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas que son eficaces en el tratamiento de enfermedades víricas que incluyen VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. En otra realización, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas, y los métodos para el uso de las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas, incluyendo las composiciones farmacéuticas que las contienen, en el tratamiento de enfermedades víricas que incluyen el VHC, BVDV, coronavirus y/o VIH.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A, 1B, y 1C muestran los niveles del ARN de VHC intracelular para los Ejemplos 22, 24, y 28, respectivamente, cuando los cultivos se incuban con los compuestos ilustrativos descritos en el presente documento a las dosis que se muestran. Cada compuesto de ensayo muestra una respuesta a la dosis (μM). Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree en el presente documento que cuando los niveles del ARN de VHC se comparan entre las muestras, los datos pueden indicar que los compuestos de ensayo producen una disminución dependiente de la dosis en los niveles del ARN de VHC relativos al control infectado con VHC tratado con la simulación (no se añadieron compuestos de ensayo).

La FIG. 2 muestra que el Ejemplo 57 inhibe significativamente la transcripción inversa de VIH.

La FIG. 3 muestra que el Ejemplo 57 inhibe significativamente la integración vírica de VIH.

Las FIGS. 4A, 4B, y 4C muestran la actividad de los Ejemplos 58, 59, y 60 ilustrativos, respectivamente, frente a VIH en comparación con el control AZT.

Las FIGS. 5A, 5B, y 5C muestran que el Ejemplo 57 inhibe significativamente la transcripción de VIH.

La FIG. 6 muestra los datos de respuesta a la dosis ilustrativos para el Ejemplo 100 frente a BVDV.

La FIG. 7 muestra la actividad anti-CV ilustrativa del Ejemplo 104. Se determinó la acción antivírica por la capacidad de 104 de reducir el efecto citopático inducido por CV (CPE) en células MRC-5. Las dosis a y por encima de $2 \mu\text{M}$ parecen presentar actividad antivírica.

Descripción detallada

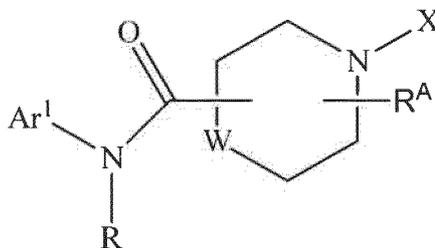
En otra realización, se describen también en el presente documento las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los compuestos. En otra realización, las composiciones farmacéuticas están en la forma de una dosis unitaria, dosis unitaria, o forma farmacéutica unitaria. En un aspecto, las composiciones, tales como dosis unitarias o formas farmacéuticas unitarias, incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del uno o más compuestos para tratar un paciente con una enfermedad vírica, tal como VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. Se entiende que las composiciones pueden incluir otros componentes y/o ingredientes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, otros compuestos terapéuticamente activos, y/o uno o más soportes, diluyentes, excipientes, y similares. En otra realización, se describen también en el presente documento métodos para utilizar los compuestos y composiciones farmacéuticas para tratar pacientes con VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. En un aspecto, los métodos incluyen la etapa de administrar uno o más de los compuestos y/o las composiciones descritas en el presente documento a un paciente con VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. En otro aspecto, los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del uno o más compuestos y/o composiciones descritas en el presente documento para tratar pacientes con VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. En otra realización, se describen también en el presente documento los usos de los compuestos y composiciones en la fabricación de un medicamento para tratar pacientes con VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH. En un aspecto, los medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del uno o más compuestos y/o composiciones para tratar un paciente con VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH.

se entenderá que los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar solos o en combinación con otros compuestos útiles para tratar el VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH, incluyendo aquellos compuestos que pueden ser terapéuticamente eficaces mediante el mismo o diferentes modos de acción. Además, se entenderá que los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar en combinación con otros compuestos que se administran para tratar otros síntomas del VHC, BVDV, coronavirus, y/o VIH.

Se describen en el presente documento métodos, composiciones, y dosis unitarias y formas farmacéuticas unitarias ilustradas mediante las siguientes cláusulas:

1. Una dosis unitaria o una forma farmacéutica unitaria para tratar una infección vírica, comprendiendo la dosis unitaria, o la forma farmacéutica unitaria

(a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en la que:

W es carbono o nitrógeno;

R^A es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido;

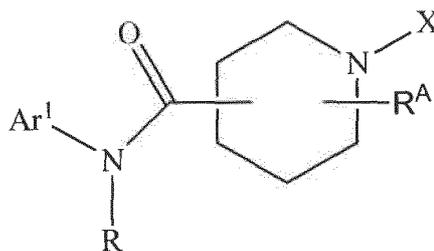
X es alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloheteroalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o acilo;

R es H, alquilo, heteroalquilo, acilo, alcoxicarbonilo, o aminocarbonilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; o R es un resto de profármaco; y

Ar¹ es arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; y

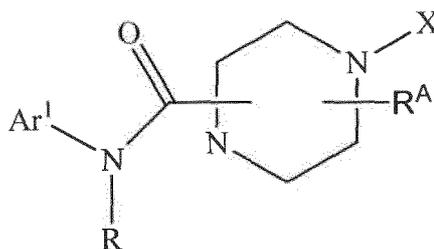
(b) uno o más soportes, excipientes, o diluyentes o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

2. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de la cláusula 1 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



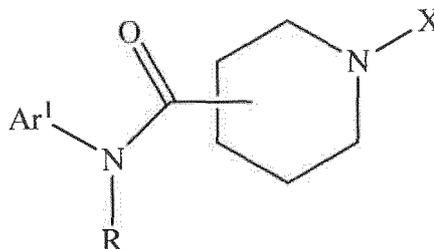
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 3. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de la cláusula 1 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



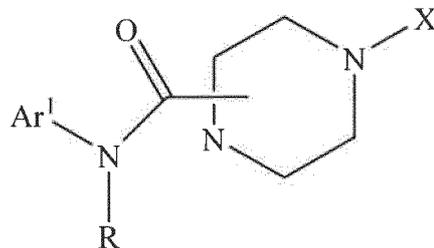
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 10 4. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que RA es H.
 5. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que RA es metilo.
 15 6. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de la cláusula 1 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 20 7. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de la cláusula 1 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 25 8. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar1 es un fenilo opcionalmente sustituido.
 9. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar1 es fenilo sustituido con fenilo opcionalmente sustituido.
 30 10. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar1 es fenilo sustituido con fenoxi opcionalmente sustituido.
 11. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar1 es fenilo sustituido con heteroarilo opcionalmente sustituido.
 12. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar1

es fenilo sustituido con bencimidazolilo opcionalmente sustituido.

13. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar¹ es fenilo sustituido con indolilo opcionalmente sustituido.

5 14. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar¹ es arilfenilo, arilarilo, fenilfenilo, fenoxifenilo, o 2-fenilfenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

15. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que R es H o un resto de profármaco.

16. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que R es H.

10 17. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es cicloheteroalquilo opcionalmente sustituido.

18. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es piperidinilo opcionalmente sustituido.

15 19. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es un alquil piperidinilo.

20. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es un N-alquil piperidinilo.

21. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es acilo.

20 22. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es alquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, o alquilcarbonilo.

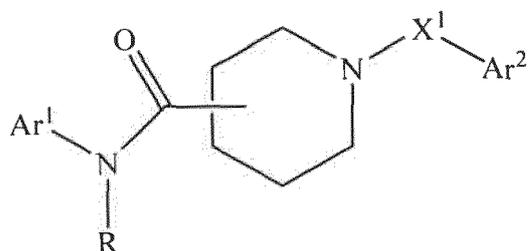
23. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es alquilo.

25 24. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es cicloalquilo.

25. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es alquenilo.

26. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X es cicloalquenilo.

30 27. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un compuesto de la formula



35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

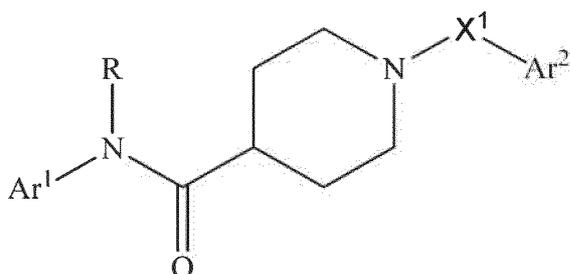
X¹ es un enlace o alquileo C₁-C₅, alquenileno C₁-C₅, o C(O); y

Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

40 28. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que -C(O)NRAr¹ está unido a C₃.

29. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que -C(O)NRAr¹ está unido a C₄.

45 30. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un compuesto de la formula

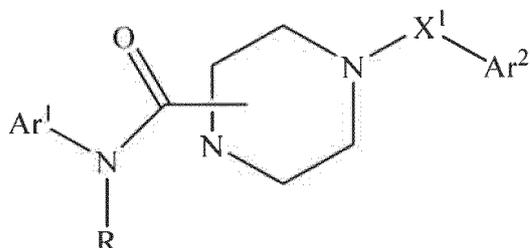


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

X¹ es un enlace o alquileo C₁-C₅, alquilenilo C₁-C₅, o C(O); y

Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

- 5 31. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un compuesto de la fórmula

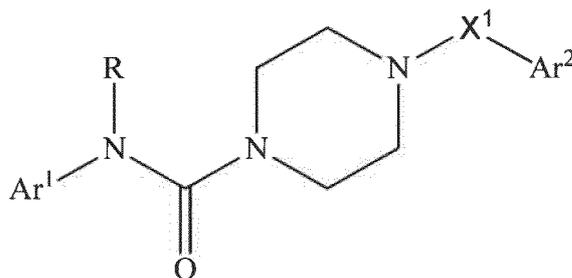


- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

X¹ es un enlace o alquileo C₁-C₅, alquilenilo C₁-C₅, o C(O); y

Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

- 15 32. La dosis unitaria o la forma farmacéutica de la cláusula anterior en la que -C(O)NRAr¹ se une a N1.
33. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un compuesto de la fórmula

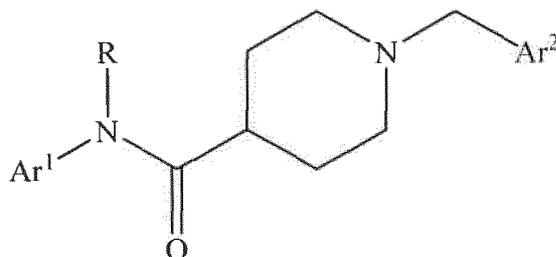


- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

25 X¹ es un enlace o alquileo C₁-C₅, alquilenilo C₁-C₅, o C(O); y

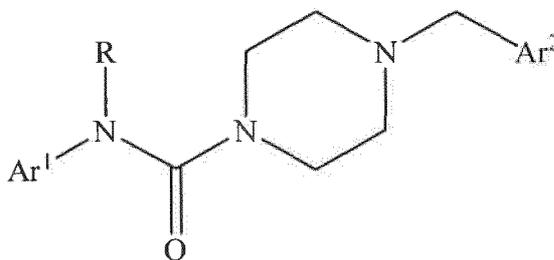
Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

- 30 34. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X¹ es alquileo C₄-C₅ o alquilenilo C₁-C₅.
35. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X¹ es alquileo C₁-C₅.
36. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que X¹ es CH₂.
37. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que



- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:
Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

38. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un compuesto de la fórmula



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

39. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es fenilo opcionalmente sustituido.

10 40. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es un fenilo sustituido.

41. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es heteroarilo opcionalmente sustituido.

15 42. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es heteroarilo sustituido.

43. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es pirazolilo opcionalmente sustituido.

44. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es pirazolilo sustituido.

20 45. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es furilo opcionalmente sustituido.

46. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es furilo sustituido.

25 47. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es pirazinilo opcionalmente sustituido.

48. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es pirazinilo sustituido.

49. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es piradizinilo opcionalmente sustituido.

30 50. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es piradizinilo sustituido.

51. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es quinolinilo o metilendioxifenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

35 52. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es un grupo quinolinilo opcionalmente sustituido.

53. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que Ar² es hidroxifenilo, metoxifenilo, o hidroximetoxifenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

54. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que los sustituyentes son grupos donantes de electrones.

40 55. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección de un virus de ADN o ARN.

56. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección por VHC.

45 57. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección por VIH.

58. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección por BVDV.

59. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección por coronavirus.

50 60. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las cláusulas anteriores en la que la infección vírica es una infección por SARS-coronavirus.

61. Un método para tratar una infección vírica en un animal hospedador, comprendiendo el método la etapa de administrar al animal hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más dosis unitarias de una cualquiera de las cláusulas 1 a 60.

55 62. El método de la cláusula 61 en el que la infección vírica es una infección de un virus de ADN o ARN.

63. El método de la cláusula 61 o 62, en el que el animal hospedador es un ser humano.

64. El método de la cláusula 63, en el que la infección vírica es una infección por VHC.

65. El método de la cláusula 63, en el que la infección vírica es una infección por VIH.
 66. El método de la cláusula 63, en el que la infección vírica es una infección por coronavirus.
 67. El método de la cláusula 63, en el que la infección vírica es una infección por SARS-coronavirus.
 68. El método de la cláusula 61 o 62, en el que el animal hospedador es un bovino.
 5 69. El método de la cláusula 68, en el que la infección vírica es una infección por BVDV.

En cada una de las anteriores y siguientes realizaciones, se entenderá que las fórmulas incluyen y representan no solo todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, sino que también incluyen cualquiera y todos los hidratos y/o solvatos de las fórmulas de los compuestos. Se aprecia que determinados grupos funcionales, tales como los grupos hidroxilo, amino, y similares forman complejos y/o compuestos de coordinación con agua y/o diversos disolventes, en las diversas formas físicas de los compuestos. Por consiguiente, se entenderá que las fórmulas anteriores incluyen y representan aquellos diversos hidratos y/o solvatos. En cada una de las anteriores y siguientes realizaciones, se entenderá también que las fórmulas incluyen y representan cada isómero posible, tal como estereoisómeros e isómeros geométricos, individualmente y en cualquiera y todas las mezclas posibles. En cada una de las anteriores y siguientes realizaciones, se entenderá también que las fórmulas incluyen y representan cualquiera y todas las formas cristalinas, formas parcialmente cristalinas, y formas no cristalinas y/o amorfas de los compuestos.

Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden ser amorfos así como ser cualquiera y todas las formas morfológicas. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden estar en la forma de solvatos, incluyendo hidratos, u otros solvatos.

los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros quirales, o pueden ser de otro modo capaces de existir como estereoisómeros múltiples. Se entiende que en una realización, la invención descrita en el presente documento no se limita a cualquier requerimiento estereoquímico concreto, y que los compuestos, y composiciones, métodos, usos y medicamentos que los incluyen pueden ser ópticamente puros, o pueden ser cualquiera de varias mezclas estereoisómeras, incluyendo mezclas racémicas y otras mezclas de enantiómeros, otras mezclas de diastereómeros, y similares. Se entenderá también que dichas mezclas de estereoisómeros pueden incluir una única configuración estereoquímica en uno o más centros quirales, incluyendo a la vez mezclas de configuración estereoquímica en uno o más centros quirales diferentes.

Asimismo, los compuestos descritos en el presente documento pueden incluir centros geométricos, tales como cis, trans, dobles enlaces E y Z. Se entenderá que en otra realización, la invención descrita en el presente documento no se limita a cualquier requerimiento de isómero geométrico concreto, y que los compuestos, y composiciones, métodos, usos y medicamentos que los incluyen pueden ser puros, o pueden ser cualquiera de varias mezclas de isómeros geométricos. Se entenderá también que dichas mezclas de isómeros geométricos pueden incluir una única configuración en uno o más dobles enlaces, incluyendo a la vez mezclas de geometría en uno o más dobles enlaces diferentes.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada. Como se usa en el presente documento, los términos "alquenilo" y "alquinilo" incluyen cada uno una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada, e incluye al menos un doble enlace o triple enlace, respectivamente. Se entenderá que alquinilo puede incluir también uno o más dobles enlaces. Se entenderá además que en determinadas realizaciones, alquilo es ventajosamente de longitud limitada, incluyendo C₁-C₂₄, C₁-C₁₂, C₁-C₈, C₁-C₆, y C₁-C₄. De manera ilustrativa, dichos grupos alquilo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₁-C₈, C₁-C₆, y C₁-C₄ pueden denominarse alquilo inferior. Se entenderá además que en determinadas realizaciones alquenilo y/o alquinilo pueden ser cada uno ventajosamente de longitud limitada, incluyendo C₂-C₂₄, C₂-C₁₂, C₂-C₈, C₂-C₆, y C₂-C₄. De manera ilustrativa, tales como grupos alquenilo y/o alquinilo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₂-C₈, C₂-C₆, y C₂-C₄ pueden denominarse como alquenilo y/o alquinilo inferior. Se apreciará en el presente documento que los grupos alquilo, alquenilo, y/o alquinilo más cortos pueden añadir menos lipofilia al compuesto y, por consiguiente, tendrán diferente comportamiento farmacocinético. en realizaciones de la invención descritas en el presente documento, se entenderá, en cada caso, que la citación de alquilo se refiere a alquilo como se define en el presente documento, y opcionalmente alquilo inferior. en realizaciones de la invención descritas en el presente documento, se entenderá, en cada caso, que la citación de alquenilo se refiere a alquenilo, como se define en el presente documento, y opcionalmente alquenilo inferior. en realizaciones de la invención descritas en el presente documento, se entenderá, en cada caso, que la citación de alquinilo se refiere a alquinilo como se define en el presente documento, y opcionalmente alquinilo inferior. los grupos alquilo, alquenilo, y alquinilo ilustrativos son, aunque no de forma limitativa, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, y similares, y los grupos correspondientes que contienen uno o más dobles y/o triples enlaces, o una combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilenilo" incluye una cadena divalente de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada. Como se usa en el presente documento, el término "alquenilenilo" y "alquinilenilo" incluye una cadena divalente de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada, e incluye al menos un doble enlace o triple enlace, respectivamente. Se entenderá que alquinilenilo puede incluir también uno o más dobles enlaces. Se entenderá además que en determinadas realizaciones, alquilenilo es ventajosamente de longitud

limitada, incluyendo C₁-C₂₄, C₁-C₁₂, C₁-C₈, C₁-C₆, y C₁-C₄. De manera ilustrativa, dichos grupos alquileo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₁-C₈, C₁-C₆, y C₁-C₄ pueden denominarse alquileo inferior. Se entenderá además que en determinadas realizaciones alquilenilo y/o alquinileno pueden ser cada uno ventajosamente de longitud limitada, incluyendo C₂-C₂₄, C₂-C₁₂, C₂-C₈, C₂-C₆, y C₂-C₄. De manera ilustrativa, dichos grupos alquilenilo y/o alquinileno de longitud particularmente limitada, incluyendo C₂-C₈, C₂-C₆, y C₂-C₄ pueden denominarse como alquilenilo y/o alquinileno inferior. Se apreciará en el presente documento que los grupo alquileo, alquilenilo, y/o alquinileno inferior pueden añadir menos lipofilicidad al compuesto y, por consiguiente, tendrán diferente comportamiento farmacocinético. en realizaciones de la invención descritas en el presente documento, se entenderá, en cada caso, que la citación de alquileo, alquilenilo, y alquinileno se refiere a alquileo, alquilenilo, y alquinileno como se define en el presente documento, y opcionalmente alquileo, alquilenilo, y alquinileno inferior. los grupos alquilo ilustrativos son, aunque no de forma limitativa, metileno, etileno, n-propileno, isopropileno, n-butileno, isobutileno, sec-butileno, pentileno, 1,2-pentileno, 1,3-pentileno, hexileno, heptileno, octileno, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada, donde al menos una parte de la cadena es cíclica. Se entenderá que cicloalquilalquilo es un subconjunto de cicloalquilo. Se entenderá que cicloalquilo puede ser policíclico. el cicloalquilo ilustrativo incluye, aunque no de forma limitativa, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 2-metilciclopropilo, ciclopentileth-2-ilo, adamantilo y similares. Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilenilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada, e incluye al menos un doble enlace, donde al menos una parte de la cadena es cíclica. Se entenderá que los uno o más dobles enlaces pueden estar en la parte cíclica de cicloalquilenilo y/o en la parte no cíclica de cicloalquilenilo. Se entenderá que cicloalquilenilalquilo y cicloalquilalquilenilo son cada uno subconjuntos de cicloalquilenilo. Se entenderá que cicloalquilo puede ser policíclico. Los cicloalquilenilo ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclopentenilo, ciclohexileten-2-ilo, cicloheptenilpropenilo, y similares. Se entenderá además que la cadena que forma cicloalquilo y/o cicloalquilenilo es ventajosamente de longitud limitada, incluyendo C₃-C₂₄, C₃-C₁₂, C₃-C₈, C₃-C₆, y C₅-C₆. Se apreciará en el presente documento que las cadenas de alquilo y/o alquilenilo más cortas que forman cicloalquilo y/o cicloalquilenilo, respectivamente, pueden añadir menos lipofilicidad al compuesto y, por consiguiente, tendrán diferente comportamiento farmacocinético.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroalquilo" incluye una cadena de átomos que incluye tanto átomos de carbono como al menos un heteroátomo, y está opcionalmente ramificada. Los heteroátomos ilustrativos incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre. En determinadas variaciones, los heteroátomos ilustrativos incluyen también fósforo, y selenio. Como se usa en el presente documento, el término "cicloheteroalquilo" que incluye heterociclo y heterociclo, incluye una cadena de átomos que incluye tanto átomos de carbono como al menos un heteroátomo, tal como heteroalquilo, y está opcionalmente ramificada, donde al menos una parte de la cadena es cíclica. Los heteroátomos ilustrativos incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre. En determinadas variaciones, los heteroátomos ilustrativos incluyen también fósforo, y selenio. Los cicloheteroalquilo ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, quinuclidinilo, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" incluye grupos carbocíclicos aromáticos monocíclicos y policíclicos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. Los grupos carbocíclicos aromáticos ilustrativos descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, fenilo, naftilo y similares. Como se usa en el presente documento, El término "heteroarilo" incluye grupos heterocíclicos sustituidos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. Los grupos heterocíclicos aromáticos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, tetrazinilo, quinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, benzoimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzoisoxazolilo, bencisotiazolilo, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "amino" incluye el grupo NH₂, alquilamino, y dialquilamino, donde los dos grupos alquilo en dialquilamino pueden ser iguales o diferentes, es decir, alquilalquilamino. De manera ilustrativa, amino incluye metilamino, etilamino, dimetilamino, metiletilamino, y similares. Además, se entenderá que cuando amino modifica o está modificado por otro término, tal como aminoalquilo, o acilamino, las variaciones anteriores del término amino se incluyen en el mismo. De manera ilustrativa, aminoalquilo incluye H₂N-alquilo, metilaminoalquilo, etilaminoalquilo, dimetilaminoalquilo, metiletilaminoalquilo, y similares. De manera ilustrativa, acilamino incluye acilmetilamino, aciletilamino, y similares.

Como se usa en el presente documento, La expresión "amino y derivados del mismo" incluye amino como se describe en el presente documento, y alquilamino, alquilenilamino, alquinilamino, heteroalquilamino, heteroalquilenilamino, heteroalquinilamino, cicloalquilamino, cicloalquilenilamino, cicloheteroalquilamino, cicloheteroalquilenilamino, arilamino, arilalquilamino, arilalquinilamino, arilalquinilamino, heteroarilamino, heteroarilalquilamino, heteroarilalquilenilamino, heteroarilalquinilamino, acilamino, y similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. La expresión "derivado de amino" incluye también urea, carbamato, y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hidroxi y derivados del mismo" incluye OH y alquiloxi,

alqueniloxi, alquiniloxi, heteroalquiloxi, heteroalqueniloxi, heteroalquiniloxi, cicloalquiloxi, cicloalqueniloxi, cicloheteroalquiloxi, cicloheteroalqueniloxi, ariloxi, arilalquiloxi, arilalqueniloxi, arilalquiniloxi, heteroariloxi, heteroarilalquiloxi, heteroarilalqueniloxi, heteroarilalquiniloxi, aciloxi, y similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. La expresión "derivado de hidroxilo" incluye también carbamato, y similares.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "tio y derivados del mismo" incluye SH y alquiltio, alqueniltio, alquiniltio, heteroalquiltio, heteroalqueniltio, heteroalquiniltio, cicloalquiltio, cicloalqueniltio, cicloheteroalquiltio, cicloheteroalqueniltio, ariltio, arilalquiltio, arilalqueniltio, arilalquiniltio, heteroariltio, heteroarilalquiltio, heteroarilalqueniltio, heteroarilalquiniltio, aciltio, y similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. La expresión "derivado de tio" incluye también tiocarbamato, y similares.

15 Como se usa en el presente documento, el término "acilo" incluye formilo, y alquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alquinilcarbonilo, heteroalquilcarbonilo, heteroalquenilcarbonilo, heteroalquinilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, cicloalquenilcarbonilo, cicloheteroalquilcarbonilo, cicloheteroalquenilcarbonilo, arilcarbonilo, arilalquilcarbonilo, arilalquenilcarbonilo, arilalquinilcarbonilo, heteroarilalquilcarbonilo, heteroarilalquenilcarbonilo, heteroarilalquinilcarbonilo, acilcarbonilo, y similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "carbonilo y derivados del mismo" incluye el grupo C(O), C(S), C(NH) y los derivados de amino sustituidos del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido carboxílico y derivados del mismo" incluye el grupo CO₂H y las sales del mismo, y los ésteres y amidas del mismo, y CN.

25 Como se usa en el presente documento, La expresión "ácido sulfínico o un derivado del mismo" incluye SO₂H y las sales del mismo, y los ésteres y amidas del mismo.

Como se usa en el presente documento, La expresión "ácido sulfónico o un derivado del mismo" incluye SO₃H y las sales del mismo, y los ésteres y amidas del mismo.

30 Como se usa en el presente documento, el término "sulfonilo" incluye alquilsulfonilo, alquenilsulfonilo, alquinilsulfonilo, heteroalquilsulfonilo, heteroalquenilsulfonilo, heteroalquinilsulfonilo, cicloalquilsulfonilo, cicloalquenilsulfonilo, cicloheteroalquilsulfonilo, cicloheteroalquenilsulfonilo, arilsulfonilo, arilalquilsulfonilo, arilalquenilsulfonilo, arilalquinilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, heteroarilalquilsulfonilo, heteroarilalquenilsulfonilo, heteroarilalquinilsulfonilo, acilsulfonilo, y similares, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

35 La expresión "opcionalmente sustituido" como se usa en el presente documento incluye la sustitución de átomos de hidrógeno con otros grupos funcionales en el radical que está opcionalmente sustituido. Dichos otros grupos funcionales incluyen de manera ilustrativa, aunque no de forma limitativa, amino, hidroxilo, halo, tior, alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilheteroalquilo, nitro, ácidos sulfónicos y derivados de los mismos, ácidos carboxílicos y derivados de los mismos, y similares. De manera ilustrativa, cualquiera de amino, hidroxilo, tior, alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilheteroalquilo, y/o ácido sulfónico está opcionalmente sustituido.

45 Como se usa en el presente documento, las expresiones "arilo opcionalmente sustituido" y "heteroarilo opcionalmente sustituido" incluyen la sustitución de átomos de hidrógeno con otros grupos funcionales en el arilo o heteroarilo que está opcionalmente sustituido. Dichos otros grupos funcionales incluyen de manera ilustrativa, aunque no de forma limitativa, amino, hidroxilo, halo, tio, alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilheteroalquilo, nitro, ácidos sulfónicos y derivados de los mismos, ácidos carboxílicos y derivados de los mismos, y similares. De manera ilustrativa, cualquiera de amino, hidroxilo, tio, alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilheteroalquilo, y/o ácido sulfónico está opcionalmente sustituido.

55 Los sustituyentes ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, un radical -(CH₂)_xZ^X, donde x es un entero de 0-6 y Z^X se selecciona entre halógeno, hidroxilo, alcaniloxi, incluyendo alcaniloxi C₁-C₆, ariloxi opcionalmente sustituido, alquilo, incluyendo alquilo C₁-C₆, alcoxi, incluyendo alcoxi C₁-C₆, cicloalquilo, incluyendo cicloalquilo C₃-C₈, cicloalcoxi, incluyendo cicloalcoxi C₃-C₈, alquenilo, incluyendo alquenilo C₂-C₆, alquinilo, incluyendo alquinilo C₂-C₆, haloalquilo, incluyendo haloalquilo C₁-C₆, haloalcoxi, incluyendo haloalcoxi C₁-C₆, halocicloalquilo, incluyendo halocicloalquilo C₃-C₈, halocicloalcoxi, incluyendo halocicloalcoxi C₃-C₈, amino, alquilamino C₁-C₆, (alquil C₁-C₆)(alquil C₁-C₆)amino, alquilcarbonilamino, N-(alquil C₁-C₆)alquilcarbonilamino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo C₁-C₆, (alquil C₁-C₆)(alquil C₁-C₆)aminoalquilo, alquilcarbonilaminoalquilo, N-(alquil C₁-C₆)alquilcarbonilaminoalquilo, ciano, y nitro; o Z^X se selecciona entre -CO₂R⁴ y -CONR⁵R⁶, donde R⁴, R⁵, y R⁶ se seleccionan cada uno de manera independiente en cada incidencia entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, aril-alquilo C₁-C₆, y heteroaril-alquilo C₁-C₆.

65 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que estimula la respuesta biológica o médica en un sistema tejido, animal o

ser humano que es buscada por un investigador, veterinario, médico u otro especialista clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz es la que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que la utilización diaria total de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento se decidirá por el médico a cargo del tratamiento dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente en particular dependerá de diversos factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, el género y dieta del paciente: el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o a la vez con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico de capacidades normales.

Se apreciará también que la cantidad terapéuticamente eficaz, tanto en referencia a la monoterapia como al tratamiento combinado, se selecciona ventajosamente con referencia a cualquier toxicidad, u otro efecto secundario indeseable, que se puede producir durante la administración de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. Además, se apreciará que las terapias simultáneas descritas en el presente documento pueden permitir la administración de dosis más bajas de compuestos que muestran dicha toxicidad, u otro efecto secundario indeseable, donde aquellas dosis más bajas están por debajo de los umbrales de toxicidad o por debajo en la ventana terapéutica que podría administrarse de otra forma en ausencia de una terapia simultánea.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" se refiere a cualquier producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de las combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Se entenderá que las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse a partir de los compuestos aislados descritos en el presente documento o a partir de sales, soluciones, hidratos, solvatos, y otras formas de los compuestos descritas en el presente documento. Se entenderá también que las composiciones pueden prepararse a partir de formas amorfas, no amorfas, parcialmente cristalinas, cristalinas, y/u otras formas morfológicas de los compuestos descritos en el presente documento. Se entenderá también que las composiciones pueden prepararse a partir de diversos hidratos y/o solvatos de los compuestos descritos en el presente documento. Por consiguiente, dichas composiciones farmacéuticas que enumeran los compuestos descritos en el presente documento se entenderá que incluyen cada uno de, o cualquier combinación de, las diversas formas morfológicas y/o formas de solvatos o hidratos de los compuestos descritos en el presente documento. De manera ilustrativa, las composiciones pueden incluir uno o más soportes, diluyentes, y/o excipientes. Los compuestos descritos en el presente documento, o las composiciones que lo contienen, pueden formularse en una cantidad terapéuticamente eficaz en cualquier forma farmacéutica convencional adecuada para los métodos descritos en el presente documento. Los compuestos descritos en el presente documento, o las composiciones que lo contienen, incluyendo dichas formulaciones, pueden administrarse mediante una amplia variedad de rutas convencionales para los métodos descritos en el presente documento y en una amplia variedad de formatos de dosificación, utilizando procedimientos conocidos (véase generalmente, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (21^a ed., 2005)).

El término "administrar" como se usa en el presente documento incluye todos los medios de introducir los compuestos y composiciones descritos en el presente documento en el paciente, incluyendo, aunque no de forma limitativa, oral (po), intravenosa (iv), intramuscular (im), subcutánea (sc), transdérmica, inhalación, bucal, ocular, sublingual, vaginal, rectal y similar. Los compuestos y composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en formas farmacéuticas unitarias y/o formulaciones que contienen soportes, adyuvantes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales. se entenderá que las dosis unitarias y/o las formas farmacéuticas unitarias descritas en el presente documento pueden ser únicas o divididas. Se entenderá también que las dosis unitarias y/o las formas farmacéuticas unitarias pueden administrarse utilizando varios protocolos de dosificación diarios, semanales, mensuales o trimestrales. Los ejemplos de protocolos de dosificación incluyen una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, o incluso en días alternos, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes, una vez al trimestre, y similares. En cada uno de estos casos se entenderá que el caso de dosis diaria, semanal, mensual, o trimestral corresponde a las cantidades terapéuticamente eficaces descritas en el presente documento. Además, Se entenderá que cuando se administra una dosis dividida, las cantidades terapéuticamente eficaces correspondientes son las totales de la dosis dividida.

Se entenderá que en los métodos descritos en el presente documento, los componentes individuales de una administración simultánea, o combinación, se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, al mismo tiempo, de forma simultánea, secuencialmente, por separado o en una única formulación farmacéutica. Cuando los compuestos o composiciones administrados simultáneamente se administran en formas farmacéuticas separadas, el número de dosificaciones administradas por día para cada compuesto puede ser igual o diferente. Los compuestos o composiciones pueden administrarse mediante la misma o diferentes rutas de administración. Los compuestos o composiciones pueden administrarse de acuerdo con regímenes simultáneos o alternantes, en los mismos o diferentes momentos durante el transcurso de la terapia, de forma simultánea en formas divididas o únicas.

La dosificación de cada compuesto de las combinaciones reivindicadas depende de varios factores, incluyendo: el

método de administración, la dolencia que se va a tratar, la gravedad de la dolencia, si la dolencia se va a tratar o evitar, y la edad, el peso, y la salud de la persona que se va a tratar. peso corporal y sexo del sujeto a tratar. Adicionalmente, la farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre la farmacocinética, farmacodinámica o perfil de eficacia de un agente terapéutico) la información acerca de un paciente concreto puede alterar la dosificación utilizada.

Además de las dosificaciones y protocolos de dosificación ilustrativos anteriores, se entenderá que una cantidad eficaz de una cualquiera o una mezcla de los compuestos descritos en el presente documento puede determinarse fácilmente por el médico diagnosticador o a cargo del tratamiento mediante el uso de técnicas conocidas y/u observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad o dosis eficaz, se consideran numerosos factores por el médico diagnosticador o a cargo del tratamiento, incluyendo, aunque no de forma limitativa especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, su tamaño, edad, y salud general, la enfermedad o trastorno específico implicado, el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad o trastorno, la respuesta del paciente individual, el compuesto concreto administrado, el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la preparación administrada, el régimen de la dosis seleccionado, el uso de medicación asociada, y otras circunstancias relevantes.

En la preparación de las composiciones farmacéuticas de los compuestos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos en cualquiera de las diversas formas descritas en el presente documento puede mezclarse con uno o más excipientes, diluirse en uno o más excipientes, o encerrarse en dicho soporte, que puede estar en la forma de una cápsula, sobrecito, un papel u otro recipiente. Los excipientes pueden servir como un diluyente, y pueden ser materiales sólidos, semisólidos, o líquidos, que actúan como vehículo, soporte o medio para el principio activo. Por lo tanto, las composiciones de la formulación pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), ungüentos, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Las composiciones pueden contener donde sea entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99,9 % en peso de principios activos, dependiendo de la dosis y la forma farmacéutica seleccionadas.

El uso eficaz de los compuestos, composiciones, y métodos descritos en el presente documento para tratar o mejorar uno o más efectos del VHC, VIH, coronavirus, y/o BVDV utilizando uno o más compuestos descritos en el presente documento puede estar basado en modelos animales, tales como modelos animales de murino, canino, porcino, y primates no humanos de la enfermedad. Por ejemplo, Se entiende que VHC, coronavirus, tales como SARS-CoV o MERS-CoV, y/o VIH en seres humanos puede caracterizarse por una pérdida de función, y/o el desarrollo de síntomas, cada uno de los cuales puede estimularse en animales, tales como ratones y otros animales de ensayo surrogados. Además, se entiende que BVDV en bovino puede caracterizarse por una pérdida de función, y/o el desarrollo de síntomas, cada uno de los cuales puede estimularse en animales alternativos, tales como ratones y otros animales de ensayo surrogados. Dichos modelo animales pueden utilizarse para evaluar los métodos de tratamiento y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para determinar las cantidades terapéuticamente eficaces descritas en el presente documento.

Los siguientes ejemplos ilustran además las realizaciones específicas de la invención; sin embargo, los siguientes ejemplos ilustrativos no deben interpretarse de cualquier modo que limite la invención.

Ejemplos

Ejemplo. Compuestos de ensayo. las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas ilustrativas descritas en el presente documento se obtienen de suministradores comerciales (>90 % de pureza) y se usa como se obtienen. Otras piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas ilustrativas descritas en el presente documento se preparan utilizando procesos convencionales.

Ejemplo. PK del compuesto de ensayo y tolerancia en ratones KMT™. Se administraron tres niveles de dosis escalados para cada uno de los compuestos de ensayo a un volumen de 5 ml/kg una vez al día mediante inyección intraperitoneal (IP). Se determinó la tolerancia durante un ciclo de tratamiento de catorce días. Los animales del estudio incluyen tres grupos de 5 ratones. Se incluyó también un grupo control de 5 ratones inyectado con 5 ml/kg de vehículo. Los grupos de ratones incluyen ratones KMT™ murinos machos y hembras de 3 meses de edad con un intervalo de peso \geq 12,0 g. Se extrajeron muestras de sangre mediante la arteria central de la cola del animal durante la medición de las concentraciones en suero del compuesto de ensayo en la mañana del Día 8, inmediatamente antes de la dosis del fármaco (mediante una muestra 24 horas después de la dosis del Día 7) y en la mañana del Día 15 (mediante una muestra 24 horas después de la dosis final del Día 14). Se recogió un volumen de aproximadamente 100 μ l en tubos, se dejó coagular a 2-8 °C, se centrifugó y se retiró el suero por encima del aglomerado del coágulo y se almacenó congelado a -80 °C hasta que estuvo listo para la medición de la concentración.

Ejemplo. Modelo de ratón quimérico. Los animales utilizados son ratones (uPA)/con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) para el activador del plasminógeno de la albúmina (Alb)-uroquinasa homocigóticos, y se alojaron en un

entorno exento de virus/exento de antígenos hasta que estuvieron listos para el uso. El modelo de ratón utilizado en el presente documento es similar a los descritos anteriormente (véase, por ejemplo, N. M. Kneteman Et Al., *Hepatology*, 2006, 43, 1346; N. M. Kneteman Et Al., *Hepatology*, 2009, 49, 745).

5 Aislamiento y trasplante de hepatocitos humanos. Segmentos de tejido hepático humano (~20 cm³) se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato fría y se transportaron rápidamente al laboratorio de aislamiento de tejidos. Los hepatocitos se aislaron y purificaron utilizando perfusión basada en colagenasa con 0,38 mg/ml de solución de Liberasa CI (Boehringer Mannheim), utilizando las técnicas descritas anteriormente (Mercer Df, Et Al., *Hepatitis C Virus Replication in Mice with Chimeric Human Livers*, *Nat. Med.* 2001,7, 927-933). Los ratones receptores (ratones uPA/SCID de 5-14 días de edad) se anestesiaron con halotano/O₂, y se inyectaron 1 x 10⁶ hepatocitos viables en el polo inferior del bazo. los hepatocitos a continuación transitan por si solos al hígado, donde se implantan y expanden.

15 Análisis de α-1 antitripsina humana. Se usó el análisis de la α-1 antitripsina humana (hAAT) para confirmar la función continua estable de los injertos de hepatocitos humanos y para determinar si cualquier cambio en el título de VHC es atribuible a la muerte o lesión de los hepatocitos. Se analizó el suero de ratón mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente (N. M. Kneteman Et Al., *Hepatology*, 2006, 43, 1346). En resumen, muestras de suero de ratón (2 µl) se diluyeron 1/100 en tampón de bloqueo y se analizaron mediante ELISA de tipo sándwich utilizando un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra alfa-antitripsina humana (hAAT) (n.º 81902, Diasorin, Stillwater MN) como el anticuerpo de captura. Una parte del mismo anticuerpo se reticuló con peroxidasa de rábano picante (n.º 31489, Pierce, Rockford, IL) y se usó como el anticuerpo secundario, con detección de la señal mediante 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma, St. Louis, MO).

25 Aislamiento y cuantificación de VHC. Se llevó a cabo el análisis del suero de murino de una manera enmascarada utilizando el sistema de vigilancia del VHC Cobas Amplicor (Roche Diagnostics). El límite inferior de la cuantificación es 600 UI/ml. Se extrajo el ARN vírico utilizando el tampón AVL de Qiagen (19073) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transcribió el ARN a ADNc con un cebador específico de VHC (5'-AGGTTTAGGATTCGTGCTCAT)(SEQ ID NO: 13) con un ARN de alta capacidad para el kit de ADNc (Applied Biosystems, n.º 4369016) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando un sistema PCR en Tiempo Real ABI 7300 y la química de Taqman, llevándose a cabo todas las mediciones por duplicado. 6-FAM-CACCCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC-TAMRA (SEQ ID NO: 14) se usó como la sonda de detección específica del VHC y un conjunto de cebadores que detectan la región 5'UTR conservada del VHC (5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA)(SEQ ID NO: 15), 5'-AGGTTTAGGATTCGTGCTCAT)(SEQ ID NO: 13)). Para la cuantificación absoluta, se creó una curva patrón de diluciones conocidas de un plásmido que contiene la secuencia de la variante H77c del VHC (pCV-H77c), junto a un control alto en ARN de VHC Optiquant (Optiquant).

35 Realización experimental. Seis semanas después del trasplante de hepatocitos, se seleccionaron los ratones según la hAAT del suero, y se inocularon los animales por encima de un corte de 100 µg/ml mediante inyección intraperitoneal con 100 µg de suero humano cargado de 1a VHC para el genotipo (aproximadamente 2 x 10⁵ copias/ml). Se obtuvieron los valores iniciales de los niveles del VHC a las 1 y 2 semanas tras el inóculo, y los ratones con títulos por encima de 2 x 10⁴ copias/ml se asignaron a los grupos experimentales. La asignación equilibraría los grupos según los títulos de VHC, los niveles de hAAT, el sexo y el peso con prioridad decreciente.

45 **Ejemplo.** Eficacia frente a la infección por VHC en ratones KMT™. El protocolo incluye tres niveles de dosis que se seleccionan basándose en los resultados de tolerabilidad y PK procedentes del estudio descrito en el Ejemplo anterior. Se determinó la eficacia de cada compuesto de ensayo durante el tratamiento del día catorce y siete días de periodo de seguimiento empleando tres niveles de dosis escaladas del compuesto de ensayo administrado a un volumen de 5 ml/kg una vez al día mediante inyección intraperitoneal. Los valores iniciales de los criterios de aceptación animal son los siguientes: valor mínimo de hAAT = 80; valor mínimo de VHC = 1 x 10⁴ UI/ml; corte del estado de salud ≤1-2. Los animales del estudio incluyen tres grupos de 5 ratones. Se incluyó también un grupo control de 5 ratones inyectado con 5 ml/kg de vehículo. Los grupos de ratones incluyen ratones KMT™ murinos machos y hembras de 3 meses de edad con un intervalo de peso de ≥12,0 g. Se extrajeron muestras de sangre a través de la arteria central de la cola para la medición de los valores iniciales de las concentraciones en suero de hAAT y VHC en el Día 3. Se realizaron posteriores extracciones de sangre la mañana del Día 7, inmediatamente antes de la dosificación del compuesto de ensayo, la mañana del Día 14, veinticuatro horas después de la dosis final del compuesto de ensayo administrada a aproximadamente las 0800 h del día anterior y en el Día 21, siete días después de la última dosis del compuesto de ensayo. Se recogió un volumen de aproximadamente 100 µl en tubos, se dejó coagular a 2-8 °C, se centrifugó y se retiró el suero por encima del aglomerado del coágulo. Las muestras de suero se almacenaron congeladas a -80° C hasta que estuvieron listas para el ensayo para los niveles de VHC y hAAT.

65 **Ejemplo.** Ensayo in vitro de la eficacia anti-VHC. Los estudios del VHC implican normalmente pacientes y chimpancés infectados. Sin embargo, recientemente, se desarrolló un sistema de infección por VHC sólido con células derivadas de la línea de células Huh-7 de hepatoma humano. Se basa en el ADN de consenso del JFH-1 VHC único derivado de un paciente con VHC. Utilizando la genética inversa, el virus infeccioso puede ser rescatado de este clon de VHC. Los virus JFH viables recuperados pueden pasarse en serie en células Huh-7. Por este motivo,

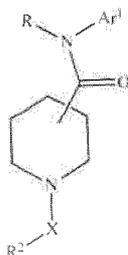
este sistema es adecuado para evaluar la actividad del compuesto de ensayo para su eficacia anti-VHC.

En resumen, 6×10^3 células Huh7-1 se incubaron durante la noche en cada pocillo de placas de 96 pocillos BioCoat revestidas de colágeno (BD Biosciences, Bedford, MA) en 0,2 ml de medio al 10 % compuesto de medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero de feto de bovino al 10 %. Posteriormente, en intervalos de 2 días, los cultivos se rellenaron con 0,2 ml de medio reciente al 10 %. Después que los cultivos se convirtieron en confluentes, continuaron rellenándose a intervalos de 2 días o 0,2 ml de medio al 10 % que incluye también dimetil sulfóxido (DMSO) al 1 %. Después de 20 días de estos rellenados, se incubaron los cultivos de Huh7-1 con medio al 1 % reciente (igual que el medio al 10 % excepto que el nivel del suero es 1 %) que contenía VHC a una multiplicidad de infección (MOI) e 0,05 unidades formadoras de foco (uff)/célula. El título de la solución madre de VHC (JFH-1wt Huh7) es $1,5 \times 10^5$ uff/ml. El día siguiente (día 1 después de la infección) y 2 días después (día 3 después de la infección) los medios se rellenaron con medio al 1 % reciente que contenía los compuestos de ensayo disueltos en DMSO. En el 5º día de tratamiento con los compuestos, se recogieron los lisados celulares para el aislamiento del ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y el medio de cultivo se recogió para el análisis de la citotoxicidad.

Se aisló el ARN total de las células por el método del tiocianato de guanidina utilizando protocolos normalizados. Se usó 1 µg de ARN para la síntesis del ADNc utilizando los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguidos por la PCR en tiempo real utilizando un termociclador en tiempo real Applied Biosystems 7300. La ciclación térmica consiste en una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C seguida por 40 ciclos de desnaturalización (15s a 95 °C) e hibridación/extensión (1m a 60 °C). Se determinaron los niveles de ARN del VHC y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con respecto a la curva patrón de diluciones en serie del plásmido que contiene el ADNc de JFH-1 VHC o de GAPDH. Los cebadores de la PCR utilizados para detectar GAPDH y VHC son: GAPDH (NMX002046) 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'(SEQ ID NO: 16) (sentido directo) y 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'(SEQ ID NO: 17) (sentido contrario) JFH-1 VHC (AB047639) 5'-TCTGCGGAACCGGTGAGTA-3'(SEQ ID NO: 18) (sentido directo) y 5'-TCAGGCAGTACCACAAGGC-3'(SEQ ID NO: 19) (sentido contrario).

Ejemplo. Se describen en el presente documento los compuestos y las actividades antivíricas en la siguiente tabla. En cada uno de los compuestos descritos en el presente documento, se entenderá que cada átomo incluye una valencia completa, donde cada átomo restante es hidrógeno.

Compuestos ilustrativos y actividad antivírica. Todos los compuestos de Ejemplo ensayados a múltiples dosis muestran una respuesta a la dosis.



Ejemplo	Ar ¹	R	Conexión del anillo	X	R ²	Actividad antivírica del VHC
16	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo	++
17	4-(3-MeC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-OH-3-MeO-C ₆ H ₃	+
21	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-OH-4-MeO-C ₆ H ₃	+++
22	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo	+++
23	4-(Bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄	+++
24	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-OH-3,5-Me ₂ -C ₆ H ₂	+++
25	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄	++
26	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-OH-C ₆ H ₄	++
27	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-(n-Bu)-imidazol-4-ilo	++
28	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2,3-Metilendioxi-C ₆ H ₃	++
29	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-OH-C ₆ H ₄	+

ES 2 684 396 T3

30	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-OH-6-MeO-C ₆ H ₃	+
31	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-OH-C ₆ H ₄	+
32	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-Me-4-MeO-C ₆ H ₃	
33	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄	+
34	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-F-2-MeO-C ₆ H ₃	+
38	3-(2-Indolil)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	(1- <i>i</i> -Pr-pirazol-4-ilo)	+
39	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	<i>t</i> -Bu	+
40	3-(2-Furil)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo	+
41	3-(2-Me-1,3,4-tiazol-5-il)C ₆ H ₄	H	C ₄	C(=O)	2-Furilo	+
42	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-OH-3-MeO-C ₆ H ₃	+
57	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	H	C ₄	C(O)	C≡C-CH ₃	++
58 (427)	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄	++
59 (252)	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo	++
60 (308)	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	H	C ₄	C(O)	tiazol-5-ilo	+
61 (P101)	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃	++
62 (P102)	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃	++
63 (P104)	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃	++
64 (P106)	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Et	++
66	4-(3,5-Me ₂ -pirazol-1-il)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂ CH=CH(E)	2-MeO-C ₆ H ₄	+
68	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-Et-5-Me-imidazol-4-ilo	+
69	3-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	CH=C(Me) ₂	++
70	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄	+
71	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	nafta-1-ilo	+
72	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-alil-3-Me-pirazol-4-ilo	+
73	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-Pr-5-Me-pirazol-4-ilo	+
74	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Me	++
75	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	--	1 -Et-piperidin-4-ilo	+++
76	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-(<i>i</i> -Pr)-3,5-Me ₂ -pirazol-4-ilo	++
77	2-PhO-piridin-5-ilo	H	C ₄	CH ₂	Ph	++
78	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo	++
79	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo	++
80	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-Pr-5-Me-pirazol-4-ilo	+
81	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-HO-5-MeO-C ₆ H ₃	++
82	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-(<i>i</i> -Pr)-pirazol-4-ilo	+
83	2-PhO-piridin-5-ilo	H	C ₄	CH ₂	5-Cl-tien-2-ilo	++
84	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2,3-(MeO) ₂ -C ₆ H ₃	+
85	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	4-HO-3-MeO-C ₆ H ₃	++
86	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	5-(<i>i</i> -Bu)-pirazol-3-ilo	+

87	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo	++
88	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2,5-Me ₂ -C ₆ H ₃	+
90	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Benzo-2,1,3-tiadiazol-5-ilo	+
91	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃	++
92	4-(bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Ciclohexen-4-ilo	+
93	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-alil-3-Me-pirazol-4-ilo	++
94	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	5-Me-furan-2-ilo	+
95	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-Et-5-Me-pirazol-4-ilo	++
96	4-(bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	3-FC ₆ H ₄	+
97	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo	++
98	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	H	C ₄	CH ₂	Piridin-2-ilo	+

Actividad antivírica: supervivencia celular en comparación con el control sin tratar. "+++" corresponde a ≤ 30 % de título vírico a 5 µm
 "++" corresponde a ≤ 60 % de título vírico a 5 µm
 "+" corresponde a ≤ 60 % de título vírico a 15 µm
 "-" corresponde a > 60 % de título vírico a 15 µm (concentración más alta ensayada)
 "nt" = no ensayado

Ejemplo: Ensayo de citotoxicidad inducida por VHC. Se evaluaron los compuestos de ensayo para determinar su citotoxicidad a las dosis usadas para la eficacia utilizando el kit de Ensayo de la citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 de Promega (Promega, Madison, WI). Este kit mide los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo, que se libera desde las células debido a la pérdida de integridad o necrosis de la membrana plasmática. Para este ensayo, se recogieron muestras de 50 µl de medio de cultivo procedentes de los mismos cultivos de 5 días usados para examinar los niveles de ARN que se muestran anteriormente. Los compuestos de ensayo descritos en el presente documento no son generalmente citotóxicos a las dosis ensayadas, y no producen generalmente daño celular aparente a las células Huh7-1.

A dosis mayores de 5 µM, los compuestos descritos en el presente documento son tan eficaces como 100 U/ml de IFN-β-1b, 10 y 80 µM de RBV, y 10 y 15 µM de MA en reducir el daño celular mediado por VHC, como se observó en las muestras del control no tratadas, infectadas con VHC tratadas de forma simulada.

Ejemplo. Tratamiento de terapia simultánea para la infección por VHC. Se ha notificado un tratamiento eficaz de pacientes infectados por VHC que requieren RBV e IFN-β-1b ya que la combinación es más potente que cada fármaco por sí mismo. Se ensayaron los compuestos descritos en el presente documento para determinar si aumenta la eficacia tanto del RBV, como de IFN-β-1 b, o una combinación de los mismos. Utilizando el protocolo descrito para determinar la reducción química evocada en el ARN intracelular del VHC, se trataron las células con y sin 10 U/ml de IFN-β-1 b en combinación con 2,5 o 10 µM de los compuestos descritos en el presente documento y para comparación con 10 µM de MA y 80 µM de RBV.

Los resultados, que se muestran en la Tabla 1, indican que estas combinaciones son más eficaces que los tratamientos individuales. El tratamiento más activo es INF-β-1b más MA, seguido en orden decreciente por IFN-β-1b más el compuesto 16, a continuación IFN-β-1b más RBV. Se observó que la combinación de IFN-β-1b con el compuesto 16 es más eficaz que la conseguida con RBV incluso aunque se use RBV a casi una dosis mayor de un orden de magnitud que el compuesto 16.

En conjunto, los resultados en la siguiente tabla indican que la combinación del compuesto 16 con IFN-β-1b reduce los niveles de ARN intracelular del VHC de forma más eficaz que cualquier agente solo.

Ejemplo	Copias de VHC promedio/µg de ARN	Veces de inhibición
Control sin tratar	9,3×10 ⁶	1
IFN-β-1b	1,9×10 ⁵	48
16 (2,5 µM)	3,3×10 ⁶	3
+ IFN-β-1b	1,1×10 ⁵	85
16 (10 µM)	2,0×10 ⁶	5
+ IFN-β-1b	9,6×10 ⁴	97
MA (10 µM)	1,7×10 ⁶	5

+ IFN- β -1b	4,4 \times 10 ⁴	211
RBV (80 μ M)	5,0 \times 10 ⁶	2
+ IFN- β -1b	1,8 \times 10 ⁵	52

Ejemplo. Ensayo contra la replicación de VIH en PBMC. Se usaron tubos BD Vacutainer de 10 ml, revestidos de heparina (n.º 367874) para recoger sangre de donantes sanos tras el consentimiento. Se usó un promedio de 10 \times 10⁶ de PBMC por tubo de 10 ml de sangre para determinar la cantidad total de sangre extraída de cada donante. Se evaluaron los compuestos de ensayo utilizando ensayos convencionales para determinar la viabilidad de IL-2 y células mononucleares de sangre periférica humana cultivadas estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) (PBMC) en presencia de los compuestos de ensayo. Se evaluaron los compuestos de ensayo utilizando ensayos convencionales sobre la replicación del VIH en dichas células infectadas con VIH. Se determinó la viabilidad celular del control mediante un ensayo colorimétrico, tal como MTS (Promega, n.º de catálogo G3582) y la replicación del VIH midiendo el nivel de antígeno p24 en la cápsida de VIH (5) utilizando un kit ELISA suministrado por los NIH. Las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se usó a una concentración final de 25 μ M. La concentración final de DMSO en el medio de crecimiento es 0,5 %. Azidotimidina (AZT), a una concentración final de 1 μ M, sirve como un control positivo mientras que DMSO en ausencia de las piperidina y piperazina carboxamidas o AZT sirve como un control negativo.

Ejemplo. Aislamiento y estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para el ensayo de viabilidad celular y la evaluación del nivel de P24 tras el tratamiento de la piperidina y piperazina carboxamida, se recogió sangre aislada recientemente de donantes sanos que habían dado su consentimiento utilizando un tubo revestido con 10 ml de heparina (BD Vacutainer n.º 367874). La sangre recogida que contiene aproximadamente 10⁷ de PBMC se diluye mezclando con una cantidad igual de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) en un tubo de 50 ml. La mezcla de sangre/PBS (por ejemplo, 40 ml) se superpuso a continuación lentamente sobre 10 ml de un medio de separación de linfocitos (Lonza, Walkersville, MD) y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente en una centrífuga Beckman Gs-6R con interrupción. Las PBMC se retiraron del tubo de centrífuga de 50 ml mediante aspiración utilizando una pipeta Pasteur estéril y se colocaron en un tubo de centrífuga de 15 ml al cual se añadió PBS para rellenar el tubo. Para retirar las plaquetas, el tubo se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min (con la interrupción activada) a fin de aglomerar las PBMC aisladas recientemente. La capa leucocitaria que contenía las PBMC se retiró cuidadosamente y se lavó 3 veces con PBS a 1400 rpm para eliminar las plaquetas residuales. El sobrenadante se decantó con las plaquetas y se añadió PBS al tubo hasta un volumen de 15 ml y se centrifugó a 1400 rpm durante 5 min, momento en el cual, el sobrenadante se decantó y el aglomerado se suspendió en 5 ml de medio de crecimiento (medio RPMI-1640 más suero de feto de bovino al 10 %, 1-glutamina al 1 % y penicilina/estreptomina al 1 %) con 20 unidades/ml de IL-2 y 4 μ g/ml de PHA y se incubó durante un día en matraces de cultivo T25 a 37 °C y CO₂ al 5 % en una estufa incubadora humidificada. Para la estimulación, se añadieron 4 μ g/ml de PHA y 20 unidades/ml de IL-2 a las células y se incubaron en un matraz T25 durante 24 h a 37 °C en una estufa incubadora con CO₂ al 5 %. Todas las etapas se llevaron a cabo en condiciones estériles.

Ejemplo. Infección de PBMC con VIH-1 Bal: VIH-1 Bal (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Frederick, MD) a una concentración de 2 ng de virus/10⁶ células se añadió a PBMC estimuladas y se incubó durante 5 h a 37 °C, en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. A continuación las células se lavaron con medio tres veces.

Ejemplo. Ensayo de VIH_{p24}. p24 es un componente de la cápsida de VIH y su detección se usa para indicar la presencia del virus. Para los ensayos de p24, se volvieron a suspender 10⁶ células por condición en 1 ml de medio RPMI completo con 20 unidades/ml de IL-2. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con azidodesoxitimidina 1,25 mM (AZT), un inhibidor de la transcriptasa inversa de VIH (Sigma, St Louis, MO), como un control positivo o dimetil sulfóxido 1,25 mM (DMSO), como el control del vehículo, o los compuestos de ensayo a diferentes concentraciones. Para los ensayos de p24, las células infectadas y tratadas se sembraron en placas a continuación en una placa de fondo en U de 96 pocillo a 200.000 células en un volumen de 200 μ l de medio por cuadruplicado durante 6 días a 37 °C, en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

Los sobrenadantes se recogieron 6 días después de la infección y se lisaron con tampón de lisis p24 (triton-X100 al 10 % en agua Milli-Q) en una relación 1:10 en una placa de cultivo de 96 pocillos. A continuación se incubó la placa a 37 °C durante 1 h a fin de lisar los viriones. Los kits ELISA p24 se pueden obtener de SAIC-Frederick (Frederick, MD) y el ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, la placa de ensayo se lavó tres veces con 200 μ l de tampón de lavado, y 100 μ l de patrones diluidos en serie (solución madre proporcionada) o se añadió la muestra a los pocillos y se incubó durante 2 h a 37 °C. A continuación, la placa se lavó tres veces con 200 μ l de tampón de lavado y se añadieron 100 μ l de solución de anticuerpo primario (siguiendo las recomendaciones del fabricante específicas para el kit usado) a cada pocillo, y la placa se incubó de nuevo durante 1 h a 37 °C. La placa se lavó de nuevo tres veces y se añadieron 100 μ l de solución de anticuerpo secundario (siguiendo las recomendaciones del fabricante específicas para el kit usado) a cada pocillo seguido por incubación durante 1 h a 37 °C. La placa se lavo para terminar tres veces y se añadieron 100 μ l de solución TMB (KPL, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se incubó durante 30 min a TA en la oscuridad. Se detuvo la reacción con 100 μ l de NaCl 1 N y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm con un fondo de 650 nm. Se utilizó un análisis de

cuatro parámetros para calcular la curva y la concentración normalizadas basándose en las lecturas de la absorbancia.

5 Para el aislamiento del ARN y los posteriores estudios de la PCR en tiempo real, 3×10^6 de células infectadas y lavadas se volvieron a suspender en medio RPMI completo con 20 unidades/ml de IL-2 y se sometieron a tratamientos adecuados como se ha mencionado anteriormente y se cultivaron en un volumen de 1 ml en placas de cultivo de 12 pocillo durante 1 a 3 días (dependiendo de los puntos temporales de ensayo del ciclo de replicación del VIH) a 37 °C, en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

10 **Ejemplo.** Se determinó la inhibición de la replicación del VIH ensayando el efecto de los compuestos de ensayo sobre los niveles de la proteína p24 de la cápsida de VIH (6) en PBMC infectadas con VIH. La cantidad de P24 se ensayó utilizando un kit de ensayo RLISA de tipo sándwich obtenido del programa de reactivos del SIDA de SAIC-Frederick (Frederick, MD) y se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. El kit incluye una placa revestida, patrones, anticuerpos primarios y secundarios. Para esta determinación de P24, un día después de la estimulación de las PBMC con IL-2 y PHA, las muestras de las PBMC estimuladas que contenían aproximadamente 15 10^6 células se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 2 ng de la solución madre de virus VIH-Bal proporcionada por el programa de referencia y reactivos del NIH SIDA a cada aglomerado y se suspendieron las células con medio de crecimiento hasta un total de 1 ml y se incubaron a 37 °C y en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Después de 4 h, se lavaron las células 3 veces con 5 ml de medio de crecimiento a 2000 rpm durante 5 min. El aglomerado final se volvió a suspender en medio de crecimiento reciente al cual se añadieron 20 unidades/ml de IL-2. Se colocaron alícuotas de 1 ml de suspensión de PBMC que contenían alrededor de 10^6 células por ml en tubos de centrifuga de 1,5 ml y se trataron con agentes químicos de ensayo. Para cada tratamiento, Se dispensaron cada una de 4 alícuotas de 200 µl (aproximadamente 2×10^5 células) en pocillos separados de una placa de 96 pocillos de fondo en U y se incubaron a 37 °C y en una estufa incubadora 20 humidificada con CO₂ al 5 %.

Después de 7 días de incubación, el sobrenadante procedente de cada pocillo se transfirió a una placa de fondo plano de 96 pocillos y se lisó con un volumen de 1/10 de Triton-x 100 al 10 % en DI-H₂O a 37 °C durante 1 h. Las 30 placas de ensayo se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado. 100 µl de patrones a 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3125 ng/ml, 0,1563 ng/ml y 0 ng/ml de lisado de p24 del control así como 100 µl de las muestras de ensayo diluido 1:10 en BSA al 1 %, Tween 20 al 0,2 % se añadieron a la placa de 96 pocillos revestidos de antígeno. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h y se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado. 100 µl de solución de anticuerpo primario diluido 1:150 en suero de feto de bovino al 10 %, se añadió suero de ratón normal al 2 % en medio RPMI a cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 h. 35 Después de tres lavados con 200 µl de tampón de lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario diluido 1:50 en suero de ratón normal al 2 %, NGS al 5 %, Tween 20 al 0,01 % en medio RPMI. Se incubaron las placas a 37 °C durante 1 h y se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado. se añadieron 100 µl de TMB, preparado mezclando volúmenes iguales de cada solución de componente proporcionada con el kit KPL (KPL Gaithersburg, MD), a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente, en la oscuridad durante 30 min. La reacción se 40 detuvo añadiendo 100 µl de NaCl 1 N y se leyeron la placas utilizando un lector de placas a 450 nm con un fondo de 650 nm. Se utilizó un análisis de cuatro parámetros para calcular la curva y la concentración normalizadas basándose en las lecturas de la absorbancia.

45 **Ejemplo.** Se infectaron PBMC durante cinco horas y se lavaron tres veces con medio. A continuación se trataron las PBMC con el compuesto de ensayo, de manera ilustrativa a 2 µM, 10 µM, y 25 µM. se midió p24 de VIH 7 días después de la infección. Los compuestos de ensayo se ensayan para la inhibición de p24 de VIH. Las PBMC se trataron con los compuestos de ensayo, de manera ilustrativa a 2 µM, 10 µM, y 25 µM durante tres días. Se llevaron a cabo los ensayos MTS 3 días después del tratamiento, y se tomaron las lecturas a 490 nm. Se evaluaron las 50 células para la viabilidad en presencia de los compuestos de ensayo.

Ejemplo. Se ensayó la viabilidad celular mediante el "CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega, n.º G3582) que evalúa la actividad metabólica de las células midiendo su capacidad de reducir MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio en presencia de metosulfato de fenazina en un producto de formazán que tiene un máximo de absorbancia a 490-500 nm (4). Para este ensayo, 10^6 PBMC 55 estimuladas en ml de medio de crecimiento se distribuyeron en alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se trataron con las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas a una concentración final de 25 µM. El control se trató solo con una concentración final de DMSO al 0.5 %, que es el disolvente del compuesto de ensayo. Tras el tratamiento, 10^5 PBMC en 100 µl de medio de crecimiento se inocularon en un pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillo con 4 réplicas para el control y cada una de las piperidina y piperazina carboxamidas sustituidas. Tras 6 60 días de incubación de la placa a 37 °C en tratamiento en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %, se añadieron 20 µl de solución MTS (Promega, n.º G3582) a cada pocillo y la placa se incubó durante 4 h a 37 °C en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %, momento en el cual se midió el desarrollo del color a una absorbancia de 490 nm en un lector de placas.

65 **Ejemplo.** Entrada de VIH. Para el análisis de entrada del VIH, Las PBMC estimuladas se pretrataron con los compuestos de ensayo a las concentraciones deseadas y AZT (control) durante 1 h y 4 h. A continuación se

infectaron las PBMC con VIH-Bal (2 ng/ml por 10^6 células) durante 5 h. A continuación se lavaron las células con medio y se trataron con tripsina para eliminar el virus unido. Las células se lavaron dos veces más y se aisló el ARN de las muestras utilizando RNEasy MiniKit (Qiagen). Se eliminó la contaminación de ADN mediante el tratamiento con la ADNasaI (Sigma) a TA durante 15 min seguido por la desnaturalización de la ADNasaI a 70 °C durante 10 min. Se llevó a cabo la síntesis del ADNc usando la supermezcla qScript ADNc. Utilizando este ADNc, se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real para cuantificar los genes diana de interés. Se usaron los siguientes cebadores para amplificar los transcritos de VIH: VIH LTR, Directo 5'-TCAAGTGAGTGCCCGGTT (SEQ ID NO: 1) e Inverso 5'-AGCTCCGGTTTCTCTTTTCGCT (SEQ ID NO: 2) y GAPDH - Directo 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCACT (SEQ ID NO: 3) e Inverso 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAAAT (SEQ ID NO: 4). Se usó GAPDH como el control endógeno. El Ejemplo 57 no tiene un efecto sobre la entrada de VIH a 10 μ M o 25 μ M.

Ejemplo. Ensayo de transcripción inversa del VIH. Los compuestos descritos en el presente documento inhiben los 2LTR circulares. Se infectaron PBMC estimuladas con VIH-Bal (2 ng/ml por 10^6 células) durante 5 h. A continuación se trataron las PBMC con compuestos a las concentraciones deseadas y AZT (control) durante 72 h después de la infección. A continuación se lavaron las células tres veces con medio y se preparó ADN genómico procedente de muestras utilizando el Kit de sangre y tejidos DNeasy (Qiagen). Para el análisis de la PCR en tiempo real, se usaron los siguientes cebadores para amplificar los 2LTR circulares (subproductos de la transcripción inversa): Directo 5'-AACTAGGGAACCCACTGCTTAAG (SEQ ID NO: 5) e Inverso 5'-CCCACAAATCAAGGATATCTTGTC (SEQ ID NO: 6). AZT (1,25 μ M, un inhibidor de la transcriptasa inversa como control positivo) inhibe significativamente la transcripción inversa de VIH. Las FIGS. 2 y 4 muestran que los compuestos descritos en el presente documento inhiben significativamente la transcripción inversa a cada concentración y parecen comenzar a inhibir al nivel de la transcripción inversa. Todos los resultados representan dos o tres experimentos independientes llevados a cabo cada uno por cuadruplicado; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ en comparación con el vehículo (1,25 μ M de DMSO).

Sin quedar ligado a teoría alguna, Se cree en el presente documento que la desigualdad de algunos de los resultados del VIH puede ser debida a la variabilidad en las respuestas de las PBMC humanas normales de diferentes individuos. Los datos de los donantes totales (n)=3 indican que los compuestos descritos en el presente documento son útiles en el tratamiento de la infección por VIH. Además, los datos muestran que los compuestos no son generalmente citotóxicos. Aunque los datos muestran una tendencia a una viabilidad celular menor, las diferencias entre el control y cada una de las dosis de ensayos no fueron estadísticamente significativas en el ensayo de citotoxicidad. Por lo tanto, sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la eficacia frente a la infección por VIH no es debida a la citotoxicidad. Las células fueron todavía viables a la concentración más alta ensayada (25 μ M).

Ejemplo. Integración del ADN genómico de VIH. Los compuestos descritos en el presente documento muestran inhibición en la integración vírica. Se infectaron PBMC estimuladas con VIH-Bal (2 ng/ml por 10^6 células) durante 5 h. A continuación se trataron las PBMC con compuestos a las concentraciones deseadas y AZT (control) durante 72 h después de la infección. A continuación se lavaron las células tres veces con medio. Se preparó ADN genómico a partir de las muestras utilizando el Kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen). Se llevó a cabo la ALU-PCR seguida por la PCR en tiempo real para cuantificar el genoma vírico integrado. Se usaron los siguientes cebadores para amplificar los transcritos de VIH: VIH LTR, Directo 5'-TCAAGTGAGTGCCCGGTT (SEQ ID NO: 1) e Inverso 5'-AGCTCCGGTTTCTCTTTTCGCT (SEQ ID NO: 2) y GAPDH - Directo 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCACT (SEQ ID NO: 3) e Inverso 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAAAT (SEQ ID NO: 4). Se usó GAPDH como el control endógeno. AZT (1,25 μ M, un inhibidor de la transcriptasa inversa) inhibe significativamente la integración vírica del VIH. La FIG. 3 muestra que el Ejemplo 57 inhibe significativamente la integración vírica en cada concentración. Todos los resultados representan dos experimentos independientes llevados a cabo; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ en comparación con el vehículo (1,25 μ M de DMSO).

Ejemplo. Transcripción del VIH. Los compuestos inhiben al nivel de la transcripción vírica. Se infectaron PBMC estimuladas con VIH-Bal (2 ng/ml por 10^6 células) durante 4-6 h. A continuación se trataron las PBMC con compuestos a las concentraciones deseadas y AZT (control) durante 72 h después de la infección. A continuación se lavaron las células tres veces con medio y se preparó ARN genómico procedente de muestras utilizando RNEasy MiniKit (Qiagen). Se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real para detectar los transcritos tempranos (Rev) y tardíos (Gag y Env) víricos maduros. Se usaron los siguientes cebadores para amplificar los transcritos de VIH: Rev, Directo 5'-TCCTTGGCACTTATCTGGGACGAT (SEQ ID NO: 7) e Inverso 5'-TCCAGAAAGTTCCACAATCCTCGT (SEQ ID NO: 8); Env, Directo 5'-ACGAGGATTGGAAGTCTTGGGA (SEQ ID NO: 9) e Inverso 5'-TGCAATTAGCAAGCTAACAGCAC (SEQ ID NO: 10); Gag, Directo 5'-AGAGAAGGCTTTCAGCCAGAAGT (SEQ ID NO: 11) e Inverso 5'-TGCACTGGATGCACTCTATCCCAT (SEQ ID NO: 12); GAPDH, Directo 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCACT (SEQ ID NO: 3) e Inverso 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAAAT (SEQ ID NO: 4). Se usó GAPDH como el control endógeno. AZT (1,25 μ M, un inhibidor de la transcriptasa inversa) inhibe significativamente la transcripción del VIH. Las FIGS. 5A, 5B, y 5C muestran que el Ejemplo 57 inhibe significativamente la transcripción vírica en cada concentración. Todos los resultados representan dos experimentos independientes llevados a cabo; ***= $p < 0,001$ en comparación con el vehículo (1,25 μ M de DMSO).

Ejemplo. Ensayo de la eficacia Anti-BVDV. Células bovinas turbinadas (BT) mantenidas como monocapas en material de laboratorio de cultivos celulares desechables se usaron para el ensayo de la eficacia antivírica. Antes del

ensayo, se sembraron cultivos de células hospedadoras en placas de cultivo de células de 96 pocillo y se utilizaron aproximadamente 48 horas después de la siembra. Se cultivaron las células para conseguir monocapas de 80-90 % de confluencia. El medio de crecimiento (GM) y el medio de mantenimiento (MM) incluyen medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con L-glutamina (ATCC n.º 30-2002), suero de caballo al 10 % y penicilina/estreptomicina (10.000 unidades de penicilina y 10.000 µg de estreptomicina por ml, Life Technologies n.º 15140-122 o similar) para una concentración final de 100 unidades de penicilina y 100 µg de estreptomicina en el medio.

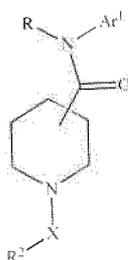
Se utilizó la cepa NADL del virus de la diarrea vírica bovina procedente de una solución madre de virus de título alto BSLI. Antes de usar, se retiraron alícuotas de la solución madre de virus y se descongelaron a partir de un congelador a -70 °C. El BVDV se diluyó en un medio de mantenimiento (MM) para obtener una multiplicidad de la infección (MOI) de 0,1.

Ejemplo. Ensayo citopático (CPE). CPE se refiere a cambios degenerativos en el cultivo de tejido BT debidos a BVDV como una consecuencia de su multiplicación. Se lavaron los cultivos de células BT con PBS y se añadieron alícuotas de 100 µl de MM a las células y se incubaron en una estufa incubadora con CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, se retiró el MM; las células se lavaron de nuevo con PBS y se superpusieron con 100 µl de las diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo. Las placas se incubaron en una estufa incubadora con CO₂ durante 48 a 72 horas. Después de que se completara la incubación, Se evaluaron las placas para la inhibición de CPE inducida por el compuesto de ensayo utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un ensayo de un tetrazol de color amarillo (MTT). Este ensayo es un ensayo colorimétrico que mide la actividad de las enzimas que reducen MTT al colorante formazán de color púrpura. CPE se confirma usando un Microscopio compuesto invertido.

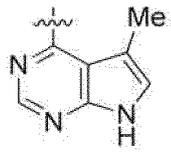
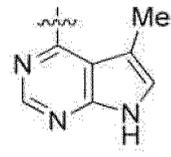
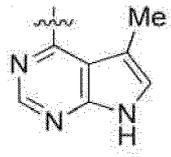
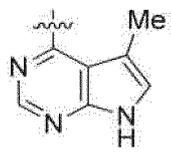
Antes de los ensayos de CPE, se ensayan los compuestos de ensayo para determinar la concentración no citotóxica más alta. Los cultivos celulares se lavaron con PBS, se superpusieron con 100 µl de MM y se incubaron durante 2 horas. Después de la incubación, se sustituyó el MM con alícuotas de 100 µl de los compuestos de ensayo a diferentes concentraciones. El ensayo de citotoxicidad incluye un control de DMSO (la dosis no excede el 0,5 %). Las placas se incubaron en una estufa incubadora con CO₂ durante 48 a 72 horas. Se evaluó la toxicidad utilizando el ensayo MTT. Los tests y ensayos se llevaron a cabo dos veces por duplicado. Los resultados que mostraban una diferencia significativa se repitieron dos veces más.

Ejemplo. Ensayo MTS (de viabilidad celular). Se evaluaron también los compuestos de ensayo en un ensayo de citotoxicidad convencional. PBMC sin infectar y estimuladas se sembraron en placas en una placa de fondo plano de 96 pocillo a 200.000 células en un volumen de 200 µl de medio por cuadruplicado durante 3 días a 37 °C, en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. se añadieron 20 µl de reactivo CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega) a cada pocillo de la placa, y la placa se incubó a 37 °C, en una estufa incubadora humidificada con CO₂ al 5 % durante 3 h. A continuación se leyó la placa en un lector de placas a 490 nm. A continuación se midieron las lecturas como porcentaje de viabilidad con respecto al control. Se aprecia que la ausencia de citotoxicidad apoya la conclusión de que la actividad del compuesto de ensayo en la reducción del título vírico es específica de la enfermedad vírica.

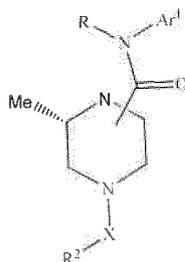
Ejemplo. Se describen en el presente documento los compuestos y las actividades antivíricas en la Tabla 4. En cada uno de los compuestos descritos en el presente documento, se entenderá que cada átomo incluye una valencia completa, donde cada átomo restante es hidrógeno. Todos los compuestos de Ejemplo ensayados a múltiples dosis muestran una respuesta a la dosis. En las siguientes tablas se muestran los compuestos ilustrativos y la actividad antivírica asociada.



Ejemplo	Ar ¹	R	Conexión del anillo	X	R ²	Actividad antivírica del BVDV
57	3-indol-2-il-Ph	H	C ₄	C(O)	C≡C-CH ₃	+++
58 (427)	4-bencimidazol-2-il-Ph	H	C ₄	CH ₂	3-MeO-Ph	+++
59 (252)	4-bencimidazol-2-il-Ph	H	C ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo	++
60 (308)	3-indol-2-il-Ph	H	C ₄	C(O)	tiazol-5-ilo	+++

99	4-(Bencimidazol-2-il)Ph	H	C ₄	--		+++
100 (2A)	3-(Indol-2-il)Ph	H	C ₄	--		+++
101	4-(2-F-PhO)Ph	H	C ₄	--		++
102 (4A)	3-(3-F-Ph)Ph	H	C ₄	--		+++

Actividad antivírica: Supervivencia celular en comparación con el control sin tratar. "+" corresponde a una supervivencia celular ≤50 a 10 μM, supervivencia mejorada sobre un control sin tratar
 "++" corresponda una supervivencia celular >50 pero <75 a 10 μM
 "+++" corresponde a una supervivencia celular ≥ 75 a 10 μM



Ejemplo	Ar ¹	R	Conexión del anillo	X	R ²	Actividad antivírica del BVDV
104 (4B)	4-(Bencimidazol-2-il)Ph	H	N1	CH ₂	Quinolin-8-ilo	+++

Actividad antivírica: Supervivencia celular en comparación con el control sin tratar. "+++" corresponde a una supervivencia celular ≥ 75 a 10 μM

5

Ejemplo. Ensayo de citotoxicidad de fibroblastos de pulmón humano (células MRC-5). Se lavaron cultivos de células MRC-5 con PBS y se incubaron con alícuotas de 100 μl de medio (EMEM con suero de feto de bovino al 2 %). Después de 2 horas de incubación, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS tratado con 100 μl de medio que contenía el compuesto de ensayo a diferentes concentraciones y se incubó durante 72 horas más. Después de esta incubación, se evaluaron las placas para la toxicidad celular utilizando el ensayo MTT. Los resultados se presentan como porcentaje de reducción en la viabilidad celular donde un 100 % es el control de DMSO sin el compuesto de ensayo.

10

15

Ejemplo. Ensayo antivírico de coronavirus. Se lavaron células MRC-5 a un 70-80 % de confluencia con solución salina tamponada con fosfato (PBS), infectadas con alícuotas de 100 μl de medio que contenía la cepa 229E de Coronavirus humano a una MOI de 0,1 y a continuación se incubaron en una estufa incubadora con CO₂ durante 2 horas para permitir la adsorción del virus. La temperatura de incubación es 35 °C ± 2 °C. tras la incubación, se retiró el inóculo de virus y se lavaron las células infectadas con pBS, se trataron con 100 μl de medio que contenía el compuesto de ensayo a las diferentes concentraciones y se incubaron durante 72 horas más. Después de la incubación, Se evaluaron las placas para CPE inducido por la cepa 229E de Coronavirus utilizando el ensayo MTT colorimétrico (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio. Este ensayo mide la viabilidad celular

20

5 evaluando la capacidad de las enzimas liberadas procedentes de las células dañadas de reducir el colorante tetrazolio a su derivado de formazán coloreado de púrpura. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de CPE donde el 100 % de inhibición de CPE producido por el virus es aproximadamente igual al promedio del control de DMSO, sin el compuesto de ensayo. En todos los estudios, la concentración final de DMSO en el medio fue del 0,5 %. El ensayo se llevó a cabo en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos.

Cada compuesto mostró una viabilidad celular mejorada sobre un control vírico sin tratar. En la siguiente tabla se muestran los resultados de los compuestos ilustrativos

Ejemplo	Actividad de CV
100 (2A)	>50 % a 4 µM
102 (4A)	>30 % a 4 µM
104 (4B)	>70 % a 14 µM

10 Publicaciones

Sepkowitz, "AIDS--the first 20 years" N Engl J Med 344(23):1764-72 (2001).
 Weiss, "How does HIV cause AIDS?" Science 260(5112):1273-9 (1993).
 15 Dybul et al., Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV "Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents" Ann Intern Med 137(5 Pt 2):381-433 (2002).
 Martinez-Picado et al., "Antiretroviral resistance during successful therapy of human immunodeficiency virus type 1 infection" Proc Natl Acad Sci USA 97(20):10948-10953 (2000).
 Cory et al., "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture" Cancer
 20 Commun 3(7):207-212 (1991); ISSN 0955-3541; PMID 1867954.
 Hashida et al., "More reliable diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by detection of antibody IgGs to pol and gag proteins of HIV-1 and p24 antigen of HIV-1 in urine, saliva, and/or serum with highly sensitive and specific enzyme immunoassay (immune complex transfer enzyme immunoassay)" J Clin Lab Anal (5):267-86 (1997). Erratum in: J Clin Lab Anal (1):76 (1998).
 25 Hagemeyer et al., "Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures" Viruses 4(11):3245-69 (2012).
 Belouzard et al., "Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein" Viruses 4(6):1011-33 (2012).
 Satija et al., "The molecular biology of SARS coronavirus" Ann N Y Acad Sci. 1102:26-38 (2007).
 30 Weiss et al., "Coronavirus pathogenesis" Adv Virus Res 81:85-164 (2011).
 Kupferschmidt, "Emerging diseases, Researchers scramble to understand camel connection to MERS" Science 341(6147):702 (2013).
 Lu et al., "Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): challenges in identifying its source and controlling its spread" Microbes Infect 15(8-9):625-9 (2013).

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NOVADRUG, LLC
- 40 <120> HETEROCICLIL CARBOXAMIDAS PARA TRATAR ENFERMEDADES VÍRICAS
- <130> 45988-701867
- <140>
- 45 <141>
- <150> 61/779.595
- <151> 03-13-2013
- 50 <150> 61/695.869
- <151> 31-08-2012
- <160> 19
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 1
 5 tcaagtgagt gcccggtt 18

 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 2
 15 agctccggtt tctcttgc t 21

 <210> 3
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 25
 <400> 3
 tgactcaac agcgacacc act 23

 <210> 4
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 35
 <400> 4
 accaccctgt tgctgtagcc aaat 24

 <210> 5
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 45
 <400> 5
 50 aactagggaa cccactgctt aag 23

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 6
 60 cccacaaatc aaggatatct tgtc 24

 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 684 396 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7
5 tccttggcac ttatctggga cgat 24

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8
15 tcccagaagt tccacaatcc tcgt 24

<210> 9
<211> 24
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9
25 acgaggattg tggaaactct ggga 24

<210> 10
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10
35 tggcattgag caagctaaca gcac 24

<210> 11
<211> 24
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 11
45 agagaaggct ttcagcccag aagt 24

<210> 12
<211> 24
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 12
55 tgcactggat gcactctatc ccat 24

<210> 13
<211> 21
60 <212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5 <400> 13
 aggttagga ttcgtgctca t 21

<210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética

15 <400> 14
 cacctatca ggcagtagca caaggcc 27

<210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 15
 tgcggaaccg gtgagtaca 19

30 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 16
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

40 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 17
 gaagatggtg atgggatttc 20

50 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 18
 tctgcggaac cggtagta 19

60 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

ES 2 684 396 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 19

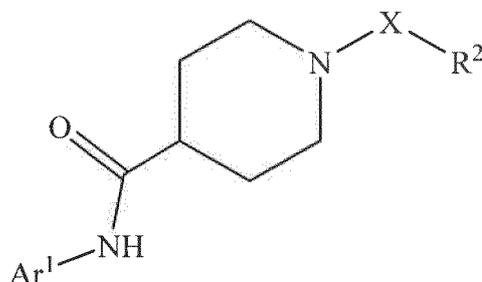
5 tcaggcagta ccacaaggc 19

REIVINDICACIONES

1. Una dosis unitaria o una forma farmacéutica unitaria para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un hospedador animal, comprendiendo la dosis unitaria, o la forma farmacéutica unitaria

5

(a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que: el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
1	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
2	4-(3-MeC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-3-MeO-C ₆ H ₃
3	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-OH-4-MeO-C ₆ H ₃
4	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
5	4-(Bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄
6	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-3,5-Me ₂ -C ₆ H ₂
7	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄
8	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-C ₆ H ₄
9	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-(n-Bu)-imidazol-4-ilo
10	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2,3-Metilendioxi-C ₆ H ₃
11	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3-OH-C ₆ H ₄
12	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-OH-6-MeO-C ₆ H ₃
13	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-C ₆ H ₄
14	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3-Me-4-MeO-C ₆ H ₃
15	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
16	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-F-2-MeO-C ₆ H ₃
17	3-(2-Indolil)C ₆ H ₄	CH ₂	(1- <i>i</i> -Pr-pirazol-4-ilo)
18	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	<i>t</i> -Bu
19	3-(2-Furil)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
20	3-(2-Me-1,3,4-tiazol-5-il)C ₆ H ₄	C(=O)	2-Furilo
21	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-3-MeO-C ₆ H ₃
22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
24	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo
25	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	tiazol-5-ilo
26	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
27	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
28	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
29	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	Et
31	4-(3,5-Me ₂ -pirazol-1-il) C ₆ H ₄	CH ₂ CH=CH (<i>E</i>)	2-MeO-C ₆ H ₄
32	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-Et-5-Me-imidazol-4-ilo
33	3-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	CH=C(Me) ₂
34	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄

35	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	nafta-1-ilo
36	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-alil-3-Me-pirazol-4-ilo
37	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Pr-5-Me-pirazol-4-ilo
38	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	Me
39	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	--	1-Et-piperidin-4-ilo
40	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-(i-Pr)-3,5-Me ₂ -pirazol-4-ilo
41	2-PhO-piridin-5-ilo	CH ₂	Ph
42	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo
43	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo
44	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Pr-5-Me-pirazol-4-ilo
45	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-5-MeO-C ₆ H ₃
46	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-(i-Pr)-pirazol-4-ilo
47	2-PhO-piridin-5-ilo	CH ₂	5-Cl-tien-2-ilo
48	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2,3-(MeO) ₂ -C ₆ H ₃
49	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	4-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
50	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	5-(i-Bu)-pirazol-3-ilo
51	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo
52	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2,5-Me ₂ -C ₆ H ₃
53	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Benzo-2,1,3-tiadiazol-5-ilo
54	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
55	4-(bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	CH ₂	Ciclohexen-4-ilo
56	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-alil-3-Me-pirazol-4-ilo
57	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	5-Me-furan-2-ilo
58	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-5-Me-pirazol-4-ilo
59	4-(bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	CH ₂	3-FC ₆ H ₄
60	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo
61	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Piridin-2-ilo

y

(b) uno o más soportes, excipientes o diluyentes o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

- 5 2. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria para el uso de la reivindicación 1, en donde el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
1	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
3	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-OH-4-MeO-C ₆ H ₃
4	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
5	4-(Bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄
6	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-3,5-Me ₂ -C ₆ H ₂
7	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄
8	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-C ₆ H ₄
9	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-(n-Bu)-imidazol-4-ilo
10	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2,3-Metilendioxi-C ₆ H ₃
22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
24	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo
26	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
27	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
28	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
29	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	Et
33	3-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	CH=C(Me) ₂

38	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	Me
39	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	--	1-Et-piperidin-4-ilo
40	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-(i-Pr)-3,5-Me ₂ -pirazol-4-ilo
41	2-PhO-piridin-5-ilo	CH ₂	Ph
42	3-(3-ClC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo
43	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo
45	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-5-MeO-C ₆ H ₃
47	2-PhO-piridin-5-ilo	CH ₂	5-Cl-tien-2-ilo
49	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	4-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
51	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	3,5,6-Me ₃ -pirazin-2-ilo
54	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	2-HO-3-MeO-C ₆ H ₃
56	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-alil-3-Me-pirazol-4-ilo
58	3-(3-FC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-5-Me-pirazol-4-ilo
60	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	1-Et-pirazol-4-ilo

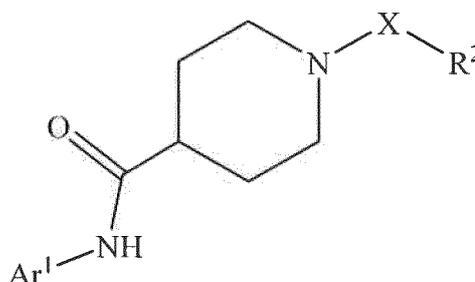
3. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria para el uso de la reivindicación 1, en donde el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

5

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
3	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	CH ₂	2-OH-4-MeO-C ₆ H ₃
4	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	Quinolin-8-ilo
5	4-(Bencimidazol-2-il)C ₆ H ₄	CH ₂	2-MeO-C ₆ H ₄
6	2-(3-MeOC ₆ H ₄)C ₆ H ₄	CH ₂	4-OH-3,5-Me ₂ -C ₆ H ₂
39	4-(2-FC ₆ H ₄ O)C ₆ H ₄	--	1-Et-piperidin-4-ilo

4. Una dosis unitaria o una forma farmacéutica unitaria para su uso en el tratamiento de una infección por BVDV en un hospedador animal, comprendiendo la dosis unitaria, o la forma farmacéutica unitaria

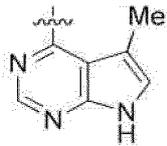
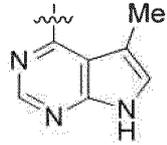
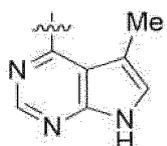
10 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

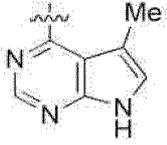
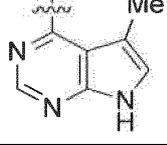
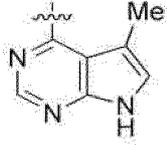
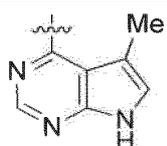
15 el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
24	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo
25	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	tiazol-5-ilo
62	4-(Bencimidazol-2-il)Ph	--	

63	3-(Indol-2-il)Ph	--	
64	4-(2-F-PhO)Ph	--	
65	3-(3-F-Ph)Ph	--	

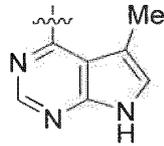
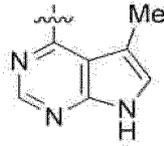
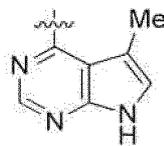
y
(b) uno o más soportes, excipientes o diluyentes o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

5. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria para el uso de la reivindicación 4, en donde el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
24	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo
25	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	tiazol-5-ilo
62	4-(Bencimidazol-2-il)Ph	--	
63	3-(Indol-2-il)Ph	--	
64	4-(2-F-PhO)Ph	--	
65	3-(3-F-Ph)Ph	--	

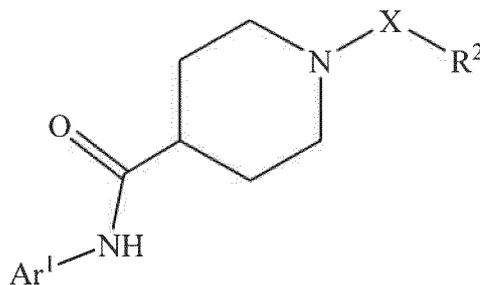
10. La dosis unitaria o la forma farmacéutica unitaria para el uso de la reivindicación 4, en donde el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
---------------------	-----------------	---	----------------

22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
25	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	tiazol-5-ilo
62	4-(Bencimidazol-2-il)Ph		
63	3-(Indol-2-il)Ph		
65	3-(3-F-Ph)Ph		

7. Una dosis unitaria o una forma farmacéutica unitaria para su uso en el tratamiento de una infección por VIH en un hospedador animal, comprendiendo la dosis unitaria, o la forma farmacéutica unitaria

- 5 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la fórmula



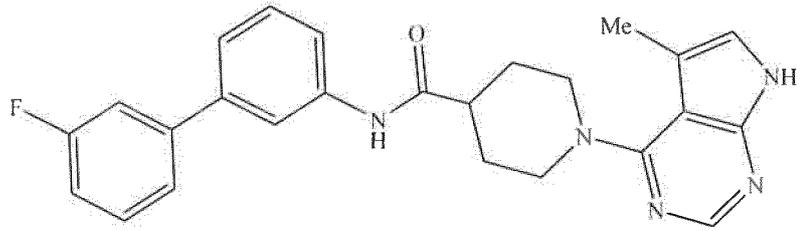
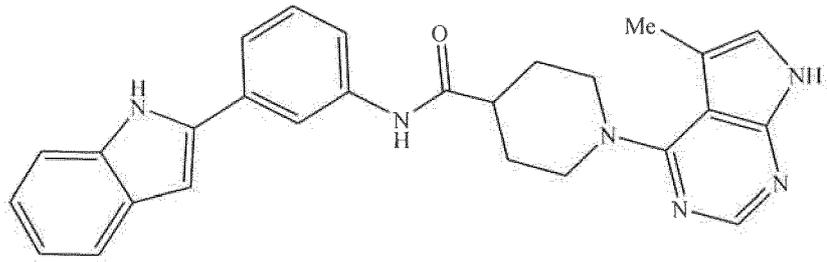
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:
el uno o más compuestos comprenden cada uno un modo de combinación de Ar¹, X y R², seleccionándose dicho modo de combinación entre el grupo que consiste en:

Modo de combinación	Ar ¹	X	R ²
22	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	C≡C-CH ₃
23	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	3-MeO-C ₆ H ₄
24	4-bencimidazol-2-ilC ₆ H ₄	CH ₂	5-Et-furan-2-ilo
25	3-indol-2-ilC ₆ H ₄	C(O)	tiazol-5-ilo

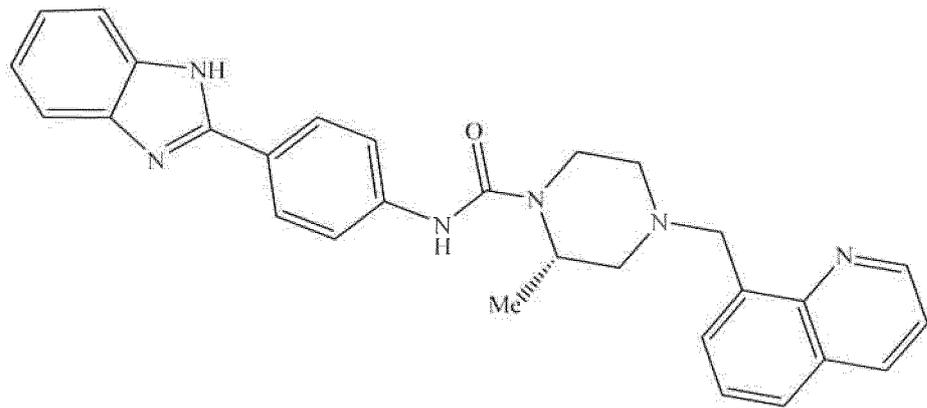
- 15 y
(b) uno o más soportes, excipientes o diluyentes o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

8. Una dosis unitaria o una forma farmacéutica unitaria para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus en un hospedador animal, comprendiendo la dosis unitaria, o la forma farmacéutica unitaria

- 20 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en:



y



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
(b) uno o más soportes, excipientes o diluyentes o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

10

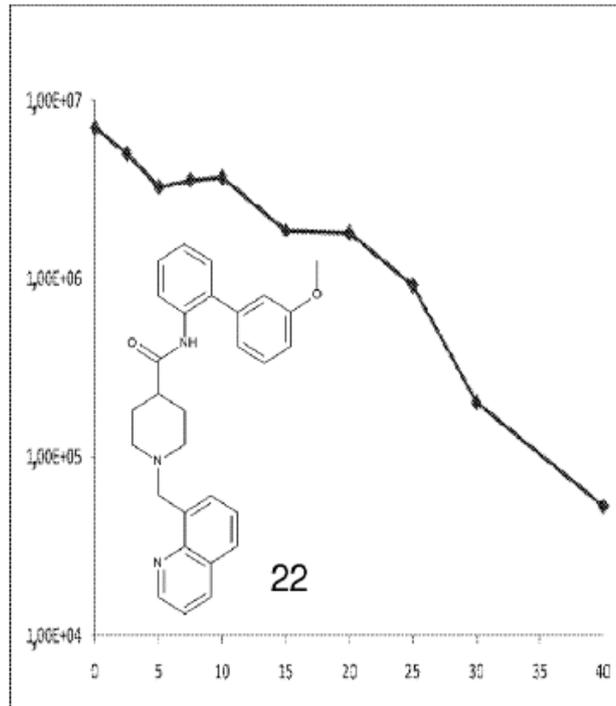


FIG. 1A

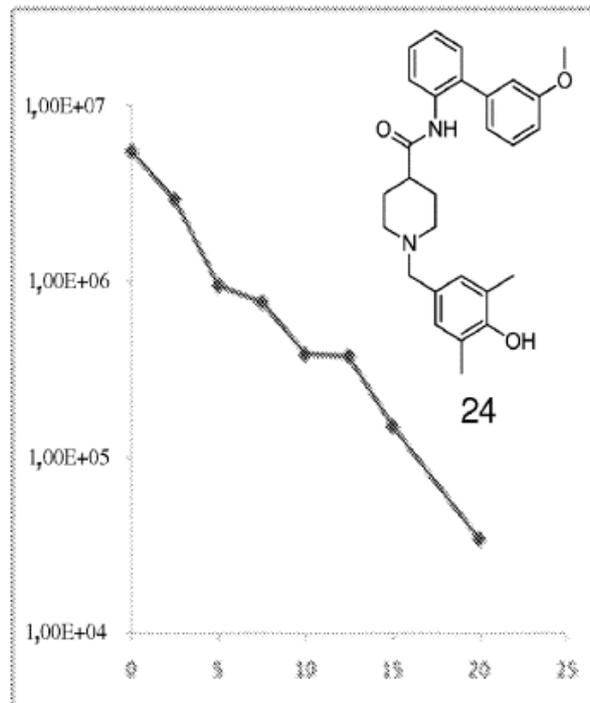


FIG. 1B

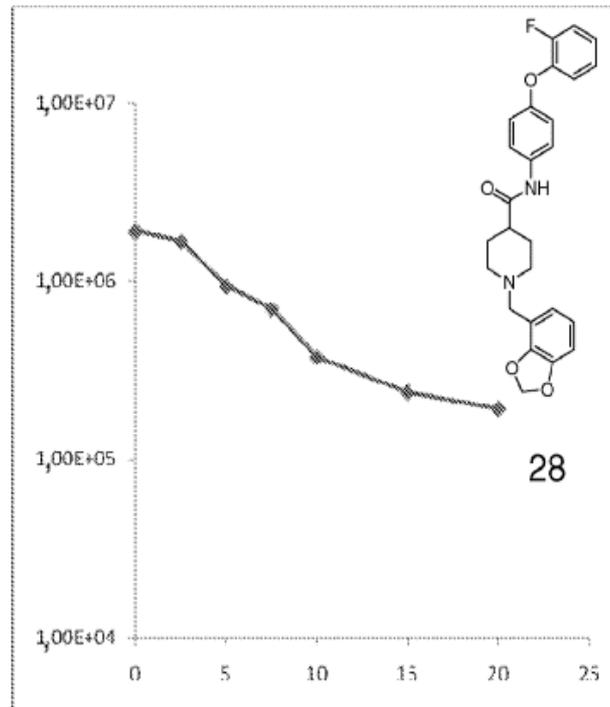


FIG. 1C

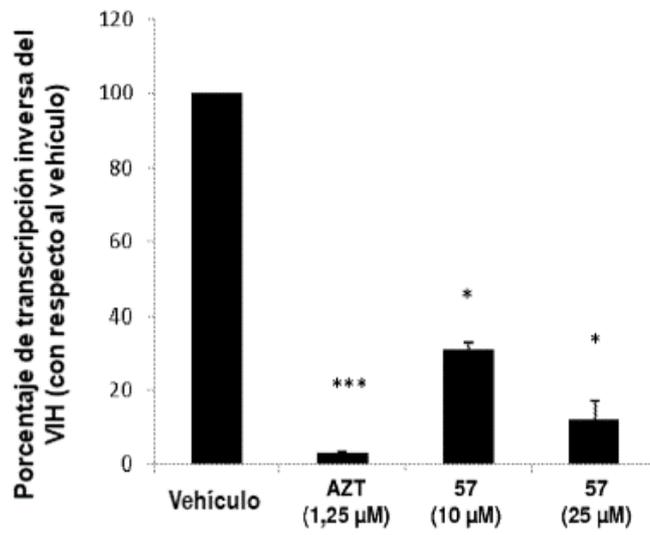


FIG. 2

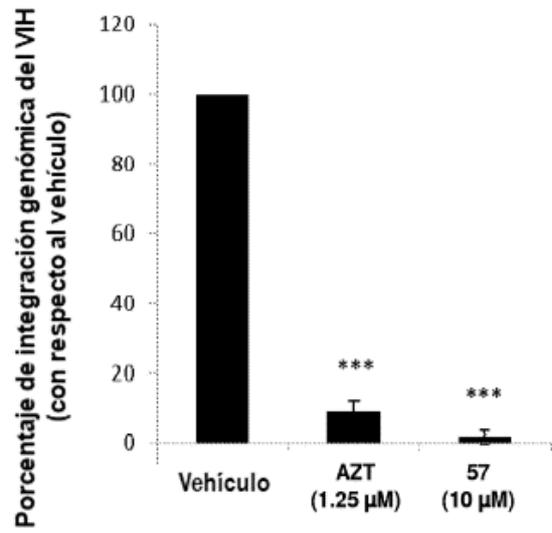


FIG. 3

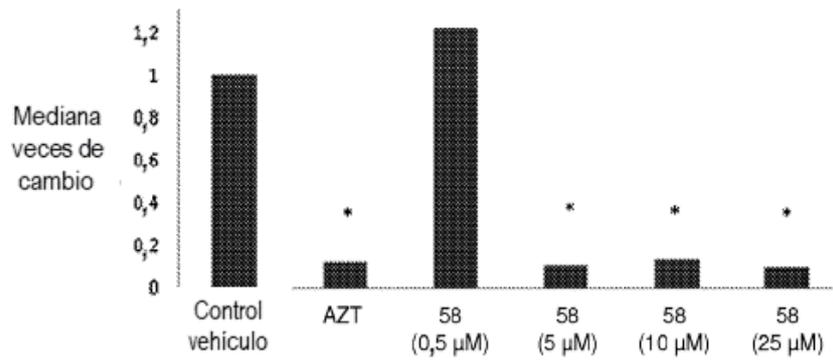


FIG. 4A

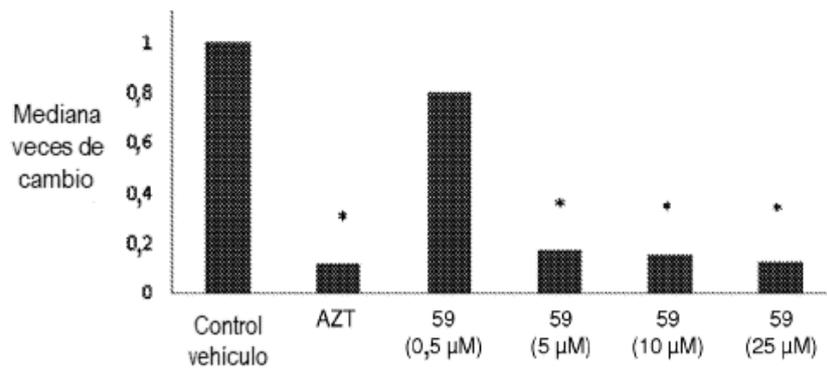


FIG. 4B

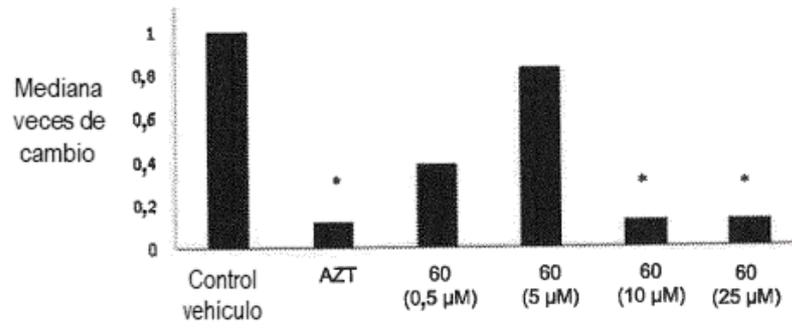


FIG. 4C

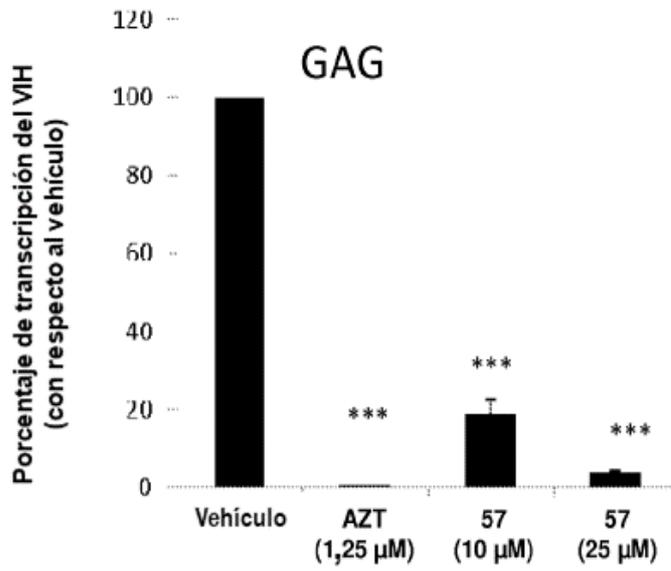


FIG. 5A

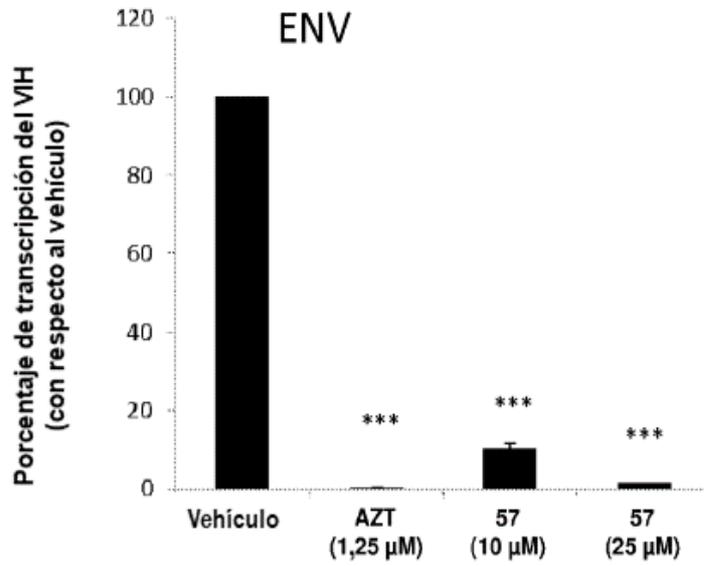


FIG. 5B

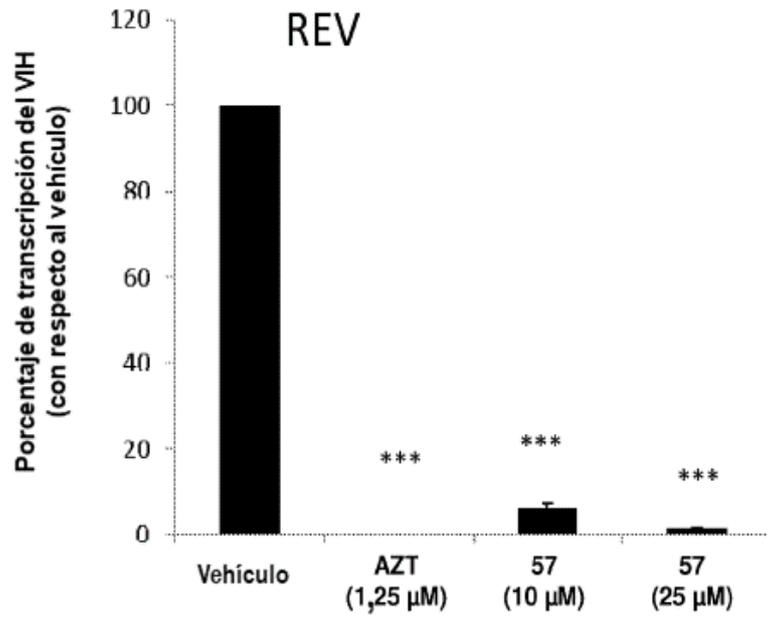


FIG. 5C

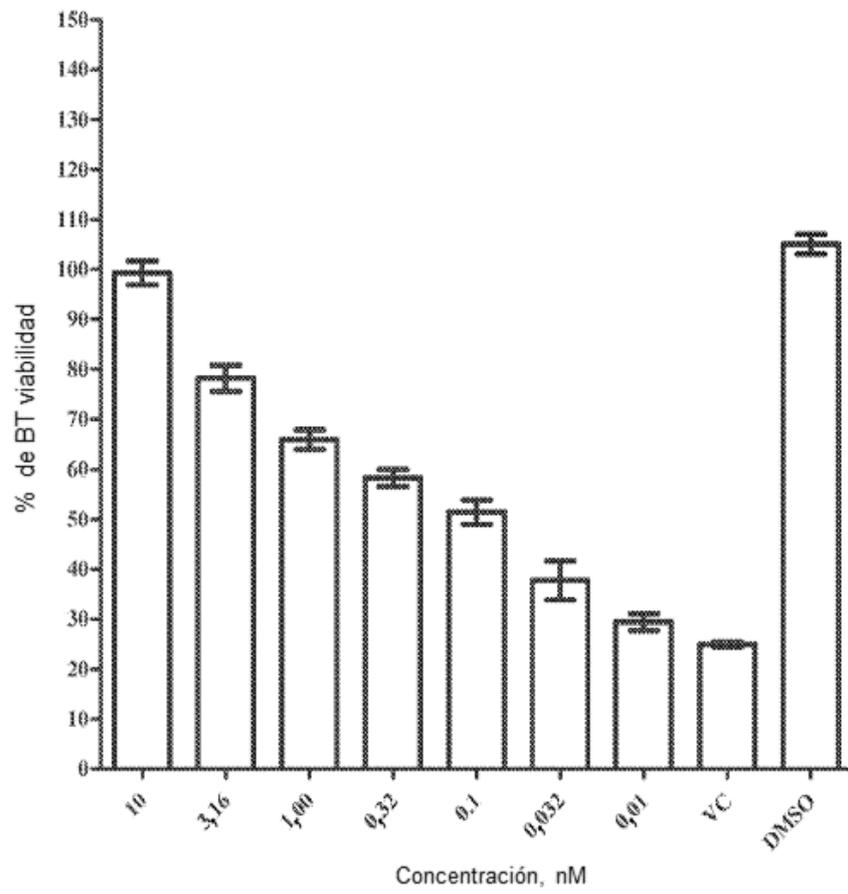


FIG. 6

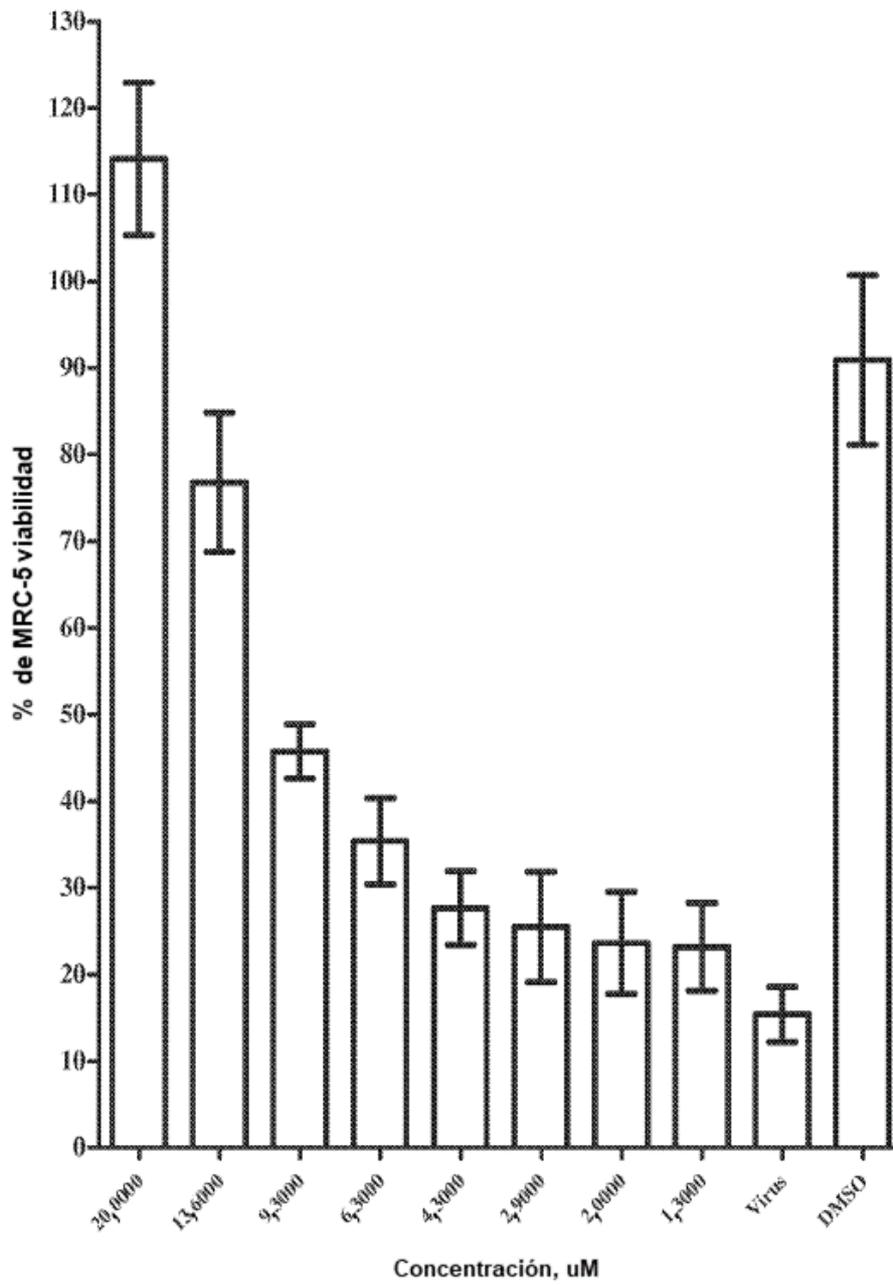


FIG. 7