

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 260**

21 Número de solicitud: 201830637

51 Int. Cl.:

C07C 217/74 (2006.01)

C07C 15/38 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

25.06.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.12.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

18.05.2020

Fecha de concesión:

05.06.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.06.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA (66.7%)
Quevedo, 2
46001 Valencia (Valencia) ES y
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GALLEGO SALA, José ;
PRADO MARTÍN, Silvia y
ALCAMÍ PERTEJO, José**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de la infección por VIH y otras enfermedades causadas por virus ARN**

57 Resumen:

Compuestos para el tratamiento de la infección por VIH y otras enfermedades causadas por virus ARN. La presente invención está dirigida al uso de compuestos orgánicos para el tratamiento de la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) así como otras enfermedades causadas por virus ARN.

ES 2 736 260 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de la infección por VIH y otras enfermedades causadas por virus ARN

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de compuestos orgánicos para el tratamiento de la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) así como otras enfermedades causadas por virus ARN.

10

Antecedentes de la invención

Según la Organización Mundial de la Salud, a finales de 2016 había más de 36 millones de personas infectadas por VIH en todo el mundo, y en ese año se produjeron 1,8 millones de nuevas infecciones y 1 millón de fallecimientos relacionados a causa de enfermedades relacionadas con el sida.

15

En los últimos años la terapia antiretroviral ha disminuido las tasas de incidencia y mortalidad de la enfermedad. El tratamiento se basa en combinaciones de tres o cuatro fármacos que inhiben la proteasa, la transcriptasa reversa o la integrasa del virus, o bien bloquean su entrada en la célula. Sin embargo, esta terapia no elimina la infección. La aparición de resistencias y la falta de una vacuna efectiva refuerzan aún más la necesidad de identificar nuevos fármacos que actúen sobre dianas alternativas del virus. Por tanto, en la actualidad sigue existiendo una necesidad muy importante de desarrollar nuevas terapias que consigan eliminar la infección causada por VIH.

25

El ARN desempeña un papel central en el funcionamiento de los seres vivos, y muchas moléculas de ARN humanas, bacterianas y virales poseen un potencial terapéutico considerable, que aún permanece sin explotar. Actualmente se usan dos estrategias para abordar este tipo de receptores. La primera se basa en la generación de agentes antisentido o ARNi, diseñados para aparearse con el ARN diana y de esta manera promover su degradación o bloquear su traducción. La segunda estrategia consiste en la síntesis de pequeñas moléculas orgánicas diseñadas para reconocer específicamente las cavidades formadas por estructuras terciarias de ARN y así interferir con su función.

30

35

Los motivos de ARN funcionales y estructurados no son fácilmente accesibles a los agentes antisentido y tienen la ventaja de una fuerte conservación de secuencia y/o

- estructura tridimensional. Este factor es importante para el desarrollo de anti-infecciosos, ya que podría resultar en una aparición más lenta de resistencias a los fármacos que actúen sobre estas estructuras. Sin embargo, exceptuando diversos antibióticos que interaccionan con sitios del ARN ribosómico bacteriano, el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a ARN se ha visto obstaculizado por las dificultades impuestas por estas estructuras, que poseen una diversidad fisicoquímica limitada y son muchas veces flexibles. Para que esta estrategia tenga éxito, es imperativo identificar nuevos esqueletos químicos y nuevos mecanismos de reconocimiento específico de ARN estructurado.
- 10 Los procesos que contribuyen a la biogénesis y el empaquetamiento de las moléculas de ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) están claramente sin explotar desde el punto de vista farmacológico. Las actividades tales como transcripción, corte y empalme, exportación nuclear y empaquetamiento implican dominios de ARN vírico y proteínas codificadas por virus con el potencial de proporcionar selectividad en
- 15 relación con los componentes del hospedador, pero no constituyen la diana de ninguno de los fármacos antirretrovirales actualmente comercializados. Estos agentes bloquean los primeros pasos del ciclo viral, incluida la entrada, retrotranscripción e integración del virus, así como la generación de viriones infectivos a través de la inhibición de la proteasa, pero no perturban la mayoría de las actividades posteriores a la integración del
- 20 virus. El descubrimiento y desarrollo de un fármaco dirigido a uno o varios pasos de la biogénesis del ARN del VIH-1 puede proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas para curar la enfermedad y también puede ayudar a aliviar el problema actual de resistencia a los tratamientos antirretrovirales.
- 25 Rev, una proteína de 116 aminoácidos codificada por virus que adopta una conformación de hélice-vuelta-hélice, se une al elemento de respuesta Rev (RRE), una estructura de 350 nucleótidos presente en transcritos de ARN vírico semiprocesados y sin procesar. La formación de la ribonucleoproteína RRE-Rev implica la asociación de varios monómeros de Rev al RRE a través de un proceso cooperativo que implica interacciones ARN-
- 30 proteína y proteína-proteína. Este proceso se desencadena mediante una interacción de alta afinidad entre un bucle interno ubicado dentro del subdominio IIB del RRE y la α -hélice de unión a ARN (designada en lo sucesivo Rev₃₄₋₅₀) del primer monómero Rev. Una vez formado, el complejo RRE-Rev se une al factor celular Crm1 para inducir la exportación nuclear de moléculas de ARN vírico semiprocesadas y sin procesar, una
- 35 etapa esencial en la fase tardía del ciclo del virus. La exportación nuclear de ARN mediada por Rev representa un objetivo potencial para la terapia anti VIH-1.

En este sentido, se han encontrado moléculas pequeñas que actúan sobre la interacción RRE-Rev. Por ejemplo, se describen moléculas pequeñas que mimetizan Rev₃₄₋₅₀ con actividad antiretroviral (Gonzalez-Bulnes et al., *Angewandte Chemie-International Edition* 52(50) (2013) 13405-13409). Se ha descrito también que el clomifeno afecta a la formación del complejo RRE-Rev *in vitro* y presenta actividad antirretroviral ex vivo, mediante bloqueo transcripcional e inhibición de la función de Rev (S. Prado et al., *Biochem Pharmacol* 107 (2016) 14-28).

- 10 No obstante, existe la necesidad de desarrollar nuevos compuestos para tratar enfermedades causadas por virus ARN, en particular por el virus VIH-1, y especialmente compuestos que actúen en las etapas posteriores a la integración del virus.

Sumario de la invención

- 15 Los investigadores han encontrado que compuestos de fórmula (I) son capaces de inhibir la interacción RRE-Rev, tanto la interacción del subdominio IIB del ARN RRE con la α -hélice de unión a ARN de Rev como la interacción RRE-Rev completa. Estos compuestos presentan también actividad antiretroviral.

- 20 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal y como se describe en este documento, o una sal o solvato del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN.

- 25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) tal y como se describe en este documento, o una sal o solvato del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN.

- 30 Otro aspecto de la invención se dirige a un método de prevención o tratamiento de infecciones causadas por virus ARN que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) tal y como se describe en este documento, o una sal o solvato del mismo.

- 35 En un aspecto más, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) tal y como se describe en este documento, o una sal o solvato del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN.

Descripción de las figuras

Figura 1. Estructura química de los compuestos **1a**, **2a** y **2b**.

Figura 2. Inhibición de la interacción IIBh-Rev₃₄₋₅₀ y de la formación del complejo RRE-Rev completo por parte de los compuestos **1a**, **2a** y **2b**. **(a)** Curvas de inhibición de IIBh-Rev₃₄₋₅₀ obtenidas con experimentos de anisotropía de fluorescencia. **(b)** Inhibición de la formación del complejo RRE-Rev completo analizada por EMSA. En (a), las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Figura 3. Reconocimiento de la horquilla de ARN IIBh por los compuestos **1a**, **2a** y **2b**.

Curvas de unión a IIBh, obtenidas con experimentos de intensidad de fluorescencia en ausencia (círculos negros) y presencia de un exceso molar de 100 veces de ARN competidor no marcado (ARNtCys; triángulos grises) o ADN de doble hélice competidor no marcado (LTRd; triángulos invertidos grises). Las barras de error representan las desviaciones estándar de dos experimentos independientes.

Figura 4. Ensayos celulares para los compuestos **1a**, **2a** y **2b**. **(a)** Actividad antiviral en función de la concentración del compuesto en experimentos de infección de células por VIH-1. La toxicidad celular (cuadrados negros) también se muestra en los mismos gráficos. **(b)** Inhibición de las etapas posteriores a la integración de VIH-1: las células se transfectaron con un plásmido de ADN que codifica un virus de longitud completa conteniendo un gen reportero de luciferasa. En todos los casos, los resultados se expresan como porcentaje de luminiscencia (RLU), donde 100% es el nivel de replicación viral obtenido en presencia del vehículo utilizado para disolver los compuestos.

Figura 5. Efecto del compuesto **1a** en el procesamiento del ARN del VIH-1. Los transcritos de ARN de VIH-1 procesados, semiprocados y completamente procesados se cuantificaron mediante RT-qPCR después del aislamiento de ARN de células transfectadas con un plásmido pNL4.3 de VIH-1 y tratadas con el inhibidor. Los resultados se expresan como cantidad relativa de ARN (RQ), usando células no tratadas como referencia (RQ = 1).

Descripción detallada de la invención

El término “halógeno” se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.

El término “alquilo” se refiere a un derivado de alcano lineal o ramificado que contiene desde 1 hasta 6 (“alquilo C₁-C₆”), preferiblemente desde 1 hasta 3 (“alquilo C₁-C₃”), átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula a través de un enlace sencillo. Ejemplos ilustrativos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo,

n-butilo, i-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a un derivado de cicloalcano que contiene de 3 a 7 ("cicloalquilo C₃-C₇"), preferiblemente de 3 a 6 ("cicloalquilo C₃-C₆"), átomos de carbono.

5 Ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente donde al menos uno de los átomos de hidrógeno se ha sustituido por un grupo halógeno, por ejemplo, CF₃, CCl₃, CHF₂, CF₂CF₃, etc.

10

El término "arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 12, preferiblemente entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1 ó 2 núcleos aromáticos condensados entre sí. Ejemplos ilustrativos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo, etc.

15

El término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente sustituido con un grupo arilo como se ha definido anteriormente, tal como (C₆-C₁₂)aril(C₁-C₆)alquilo, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alquilo y (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₃)alquilo. Ejemplos de estos grupos incluyen bencilo, feniletilo, fenilpropilo, naftilmetilo, etc.

20

El término "heterociclilo" se refiere a un sistema monocíclico, bicíclico o tricíclico que puede estar completa o parcialmente saturado o ser aromático ("heteroarilo") que contiene de 5 a 15, preferiblemente de 5 a 10, más preferiblemente de 5 o 6, átomos de anillo que contienen uno o más, específicamente uno, dos, tres o cuatro heteroátomos de anillo seleccionados independientemente de N, O y S, y siendo los átomos de anillo restantes carbono.

25

Los grupos mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones disponibles con uno o más grupos adecuados tales como OR, SR, SOR, SO₂R, OSO₂R, SO₃R, NO₂, N(R)₂, N(R)COR, N(R)SO₂R, CN, halógeno, COR, CO₂R, OCOR, OCO₂R, OCON(R)₂, CON(R)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, en el que cada uno de los grupos R está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄, y heterociclilo de 5 a 10 miembros.

35

La invención también proporciona “sales” de los compuestos descritos en la presente descripción. A modo de ilustración, dichas sales puede ser sales de adición de ácido, sales de adición de base o sales de metal, y pueden sintetizarse a partir de los compuestos originales que contienen un resto básico o ácido por medio de procedimientos químicos convencionales conocidos en la técnica. Tales sales se preparan generalmente, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de dichos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido adecuado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Los ejemplos ilustrativos de dichas sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido inorgánico tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, perclorato, nitrato, fosfato, etc., sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, canforsulfonato, etc. Los ejemplos ilustrativos de sales de adición de base incluyen sales de base inorgánica tales como, por ejemplo, sales de amonio y sales de base orgánica tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glutamina, sales básicas de aminoácidos, etc. Los ejemplos ilustrativos de sales de metal incluyen, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y litio. En una realización particular, la sal es una sal de adición de ácido.

Asimismo, los compuestos descritos en la presente descripción pueden obtenerse tanto como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, hidratos, alcoholatos, etc.), estando incluidas ambas formas dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en el estado de la técnica.

Tal y como se usa en este documento, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un organismo.

Los compuestos de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende como una cantidad que puede proporcionar un efecto terapéutico y que puede determinarse por el experto en la técnica mediante medios usados comúnmente. La cantidad eficaz variará con el trastorno particular que está tratándose, la edad y la condición física del sujeto que está tratándose, la intensidad del trastorno, la duración del tratamiento, la naturaleza de la

terapia simultánea o de combinación (si la hay), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Los expertos en la técnica apreciarán que también pueden determinarse dosificaciones con las directrices de Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición (1996), apéndice II, págs. 1707-1711 y de Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), apéndice II, págs. 475-493.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una carga, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido, inerte, no tóxico, de cualquier tipo que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico de fabricación desde un punto de vista físico/químico referente a la composición, formulación, estabilidad, aceptación por parte del paciente y biodisponibilidad. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. por Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 describe diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Composiciones farmacéuticas de la invención incluyen cualquier composición sólida (tabletas, píldoras, cápsulas, granulado, etc.), semi-sólida (cremas, ungüentos, etc.) o líquida (solución, suspensión o emulsión).

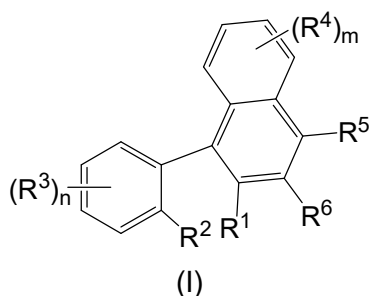
Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un paciente mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo las vías oral y parenteral.

Según son utilizados en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen pero no se limitan a, reducir, suprimir, inhibir, aliviar o afectar a la progresión, gravedad y/o alcance de un estado, posibilidad de resurgimiento o retorno de una enfermedad después de una remisión. En una realización, tratar puede incluir afectar directamente o curar, suprimir, inhibir, reducir la intensidad de, retrasar la aparición de, reducir los síntomas asociados con una infección, o una combinación de los mismos. En otra realización, tratar incluye retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de o disminuir la resistencia a tratamientos alternativos, o una combinación de los mismos.

Los términos “prevenir” y “prevención”, tal como se usan en el presente documento, incluyen pero no se limitan a, retrasar la aparición de los síntomas, prevenir la infección por un virus, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir el número o la frecuencia de episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos.

Compuestos de fórmula (I)

En un primer aspecto la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



o una sal o solvato del mismo, donde

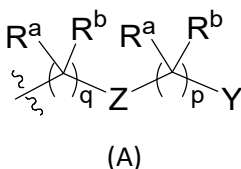
- R¹ y R² se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', C(O)R', C(O)OR', alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o R¹ y R² forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un carbociclo o heterociclo de 5 miembros;
- cada R³ y R⁴ se selecciona independientemente de halógeno, OC(O)R', SOR', SO₂R', C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o dos grupos R³ o R⁴ contiguos forman un anillo de benceno;
- R⁵ se selecciona de H, halógeno, OC(O)R', SOR', SO₂R', C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- R⁶ se selecciona de H, halógeno, OC(O)R', SOR', SO₂R', C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y

heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

- n representa 0, 1, 2, 3, o 4; y

5 - m representa 0, 1, 2, 3, o 4;

donde al menos uno de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo de fórmula (A)



donde

10 - Z se selecciona de heterociclilo de 5 a 10 miembros, O, S y NR', donde R' representa H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;

- cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', NR'₂, C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

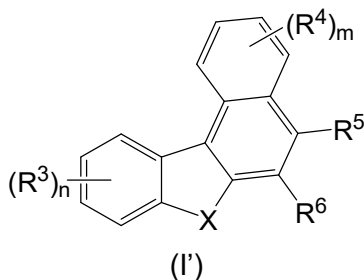
15 - Y se selecciona de H, OR', OC(O)R', NR'₂, *NR'₃, C(O)R', C(O)OR', OC(O)NR'₂, C(O)NR'₂, SR', SOR', SO₂R', cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₂ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

- p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

- q representa 0, 1, 2 o 3;

20 para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (I')



30 o una sal o solvato del mismo, donde n, m, R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son tal y como se han definido

anteriormente, y

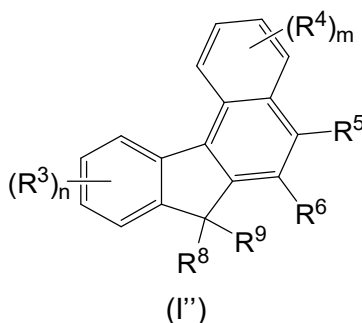
- X se selecciona de O, S, NR^7 y $\text{C}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, donde

R^7 se selecciona de H, $\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

R^8 y R^9 se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR' , $\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o

R^8 y R^9 forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo $\text{C}=\text{O}$.

- 15 Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (I'')



o una sal o solvato del mismo, donde n, m, R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^8 y R^9 son tal y como se han definido anteriormente.

Las siguientes realizaciones particulares y preferidas aplican a los compuestos de fórmula (I), (I') y (I'').

En una realización particular,

- R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR' , $\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , $\text{aril}(\text{C}_{6-12})\text{alquilo}(\text{C}_{1-6})$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o

R^1 y R^2 forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un carbociclo o heterociclo de 5 miembros;

- cada R^3 y R^4 se selecciona independientemente de halógeno, OR' , $OC(O)R'$, SR' , SOR' , SO_2R' , NR'_2 , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN , NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o dos grupos R^3 o R^4 contiguos forman un anillo de benceno;
 - R^5 se selecciona de H, halógeno, $OC(O)R'$, SOR' , SO_2R' , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN , NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
 - R^6 se selecciona de H, halógeno, OR' , $OC(O)R'$, SR' , SOR' , SO_2R' , NR'_2 , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN , NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
 - n representa 0, 1, 2, 3, o 4; y
 - m representa 0, 1, 2, 3, o 4.
- En una realización preferida, en el grupo de fórmula (A):
- Z se selecciona de heterociclilo de 5 a 10 miembros, O, S y NR' , donde R' representa H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;
 - cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, halógeno, OH, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
 - Y se selecciona de NR'_2 , $^+NR'_3$, OR' , $OC(O)NR'_2$, $C(O)NR'_2$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
 - p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y
 - q representa 0, 1, 2 o 3.

En una realización preferida, en el grupo de fórmula (A) q es 0. En otra realización cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, OH y alquilo C_{1-6} , más preferiblemente son H. En una realización particular, q es 0 y R^a y R^b se selecciona independientemente

de H, OH y alquilo C₁₋₆. Preferiblemente, q es 0 y R^a y R^b son H.

En una realización preferida, en el grupo de fórmula (A):

- Z se selecciona de heterociclilo de 5 o 6 miembros, O y NR', donde R' representa H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, OH y alquilo C₁₋₆;
- Y se selecciona de NR'₂ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y
- q representa 0.

Preferiblemente, en el grupo de fórmula (A) p se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5 o 6, más preferiblemente de 1, 2, 3 o 4.

Preferiblemente, los grupos alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, pueden estar sustituidos por halógeno, OR'', OC(O)R'', SR'', SOR'', SO₂R'', NR''₂, C(O)R'', C(O)OR'', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros.

En una realización de la invención, R⁵ se selecciona de un grupo de fórmula (A), alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆), heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, OC(O)R', SOR', SO₂R', C(O)R', C(O)OR', donde R' se selecciona independientemente de alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10.

Preferiblemente, los grupos alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros en R⁵ pueden estar opcionalmente sustituidos por halógeno, OR'', OC(O)R'', SR'', SOR'', SO₂R'', NR''₂, C(O)R'', C(O)OR'', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros.

Preferiblemente, R⁵ es un grupo de fórmula (A) tal y como se ha definido anteriormente.

En una realización, R⁶ se selecciona de H, halógeno, OH, OR', NR'₂, alquilo C₁₋₆ y

haloalquilo, donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆. Preferiblemente, R⁶ es H.

En una realización, cada R³ y R⁴ se selecciona independientemente de halógeno, OH, OR', NR'₂, alquilo C₁₋₆ y haloalquilo, donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆; o dos grupos R³ o R⁴ contiguos forman un anillo de benceno. Preferiblemente, cada R³ y R⁴ se selecciona independientemente de halógeno, OH, OR', alquilo C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆, donde R' se selecciona de alquilo C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆.

En una realización particular, n y m se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2, preferiblemente de 0 y 1. En una realización de la invención n y m son 0.

En una realización, R⁶ es H y n y m son 0.

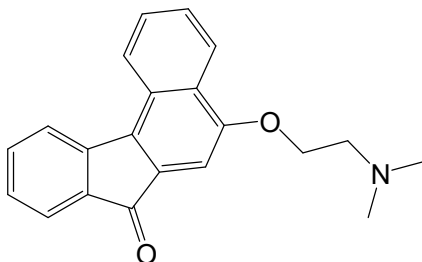
En otra realización, R⁵ es un grupo de fórmula (A) tal y como se ha definido anteriormente y R⁶ se seleccionan de H, halógeno, OH, OR', NR'₂, alquilo C₁₋₆ y haloalquilo, donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆; preferiblemente es H.

En una realización preferida, R⁵ es un grupo de fórmula (A) y R⁶ es H.

En otra realización preferida, R⁵ es un grupo de fórmula (A), R⁶ es H y n y m son 0.

En una realización particular, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆ y aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆), o R¹ y R² forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo C=O. Preferiblemente, R¹ y R² forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo C=O.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto 1a



1a

o una sal o un solvato del mismo.

En una realización de la invención, el virus ARN se selecciona de virus VIH-1, virus VIH-2, virus del síndrome respiratorio severo agudo, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, poliovirus, virus de la gripe, virus del Ébola, virus parainfluenza, rotavirus, virus chikungunya, virus de la rubeola, y virus del sarampión, entre otros.

10 Preferiblemente, el virus ARN es VIH-1.

Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitaciones de su alcance.

15 EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Compuestos. El compuesto **1a** se obtuvo a través de Sigma-Aldrich, St. Louis EEUU (librería de compuestos MyriaScreen). El compuesto **2a** (referencia) se obtuvo a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). El compuesto **2b** (referencia) se obtuvo a través de AKos GmbH (Steinen, Alemania). La Neomicina B utilizada como control en los experimentos FA se adquirió a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU) (Figura 1).

Muestras de ARN, ADN, péptido y proteína. La composición y preparación de las siguientes especies se han descrito previamente en detalle en el estado de la técnica (S. Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Gonzalez-Bulnes et al., Angewandte Chemie-International Edition 52(50) (2013) 13405-13409): secuencia de ARN de 234 nucleótidos RRE, oligonucleótidos de ARN correspondientes al subdominio IIB IIBh, IIBh-19ap y IIBh-23fl, ARNtCys de Escherichia coli, oligonucleótido autocomplementario de ADN de 26 nucleótidos LTRd, proteína Rev completa, y péptido Rev34-50 etiquetado con FITC frevp. RRE y Rev se usaron en los ensayos de EMSA, y IIBh no etiquetado se utilizó en experimentos de espectroscopía de RMN y FA. frevp se utilizó en ensayos FA. IIBh-19ap y IIBh-23fl contenían 2-amino purina en lugar de A en el nucleótido desapareado A19 del bucle y FITC unido covalentemente al nucleótido extra-helicoidal U23 del bucle, respectivamente, y se emplearon en ensayos de intensidad de fluorescencia. ARNtCys y LTRd se utilizaron como controles de especificidad de ARN y ADN en estos experimentos de intensidad de fluorescencia.

Anisotropía de fluorescencia (FA). Estos experimentos se realizaron y analizaron como se ha descrito en el estado de la técnica (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Gonzalez-Bulnes et al., Angewandte Chemie-International Edition 52(50) (2013) 13405-13409; Luedtke et al., Biopolymers 70(1) (2003) 103-19), utilizando placas de 96 pocillos y lectores de placas Victor X3 o Victor X5 (PerkinElmer, Waltham EEUU). Los ensayos usaron 10 nM de frevp y 60 nM de IIBh, e incluyeron un control positivo (una mezcla de IIBh y de frevp) y dos controles negativos (frevp y una mezcla de IIBh, frevp y neomicina B). Solo se consideró que existía inhibición de IIBh-frevp cuando la anisotropía alcanzó el valor mínimo esperado a las concentraciones más altas de inhibidor. Con el fin de garantizar que no hubiera superposición espectral con FITC, también se recogieron datos de anisotropía para cada uno de los compuestos. Ninguno de ellos emitió fluorescencia en las condiciones del ensayo. Estos experimentos se repitieron tres veces para cada compuesto.

Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Estos experimentos utilizaron 78 nM de RRE completo, 1,32 μ M de Rev completa y concentraciones crecientes de cada compuesto, y se llevaron a cabo y analizaron como se ha descrito previamente en el estado de la técnica (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Fang, et al., Cell 155(3) (2013) 594-605). Los valores de IC₅₀ se determinaron midiendo el área y la intensidad de la banda correspondiente a RRE libre. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces para cada compuesto.

Intensidad de fluorescencia. Dependiendo de los espectros de absorción de los compuestos, estos experimentos midieron asociación a las secuencias de ARN IIBh-19ap o IIBh-23fl marcadas con 2-aminopurina y fluoresceína en los residuos A19 y U23 del bucle IIB, respectivamente (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28), y se llevaron a cabo en lectores de placas SPECTRA GEMINI XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, EEUU) o Victor X5 (Perkin Elmer). La concentración de ARN IIB en estos ensayos fue 100 nM, y la especificidad respecto a ARN y ADN de las interacciones se evaluó duplicando los experimentos en presencia de un exceso molar de 100 veces (10 μ M) de ARNtCys o dúplex de ADN LTRd. Todos los experimentos de intensidad de fluorescencia se realizaron al menos tres veces para cada compuesto.

Espectroscopía de RMN. Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance de 500 MHz y se analizaron con Topspin 3.5 (Bruker Biospin, Billerica,

EEUU). La interacción entre los compuestos ensayados y muestras de ARN IIBh disueltas a una concentración de 40-60 μ M se monitorizaron como se ha descrito previamente en el estado de la técnica (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Gonzalez-Bulnes et al., Angewandte Chemie-International Edition 52(50) (2013) 13405-13409), utilizando experimentos monodimensionales y bidimensionales (TOCSY) a relaciones molares ligando:ARN crecientes.

Plásmidos, virus y células para ensayos ex vivo. Los vectores pNL4.3-Luc y pNL4.3-Ren se generaron clonando genes de luciferasa y renilla, respectivamente, en el sitio nef del plásmido proviral pNL4.3 de VIH-1 (Adachi et al., J Virol 59(2) (1986) 284-91), como se ha descrito previamente en el estado de la técnica (Garcia-Perez et al., J Med Virol 79(2) (2007) 127-37). Las células MT-2 (Harada et al., Science 229(4713) (1985) 563-6) y 293T (American Type Culture Collection, Rockville EEUU) se cultivaron como se ha descrito previamente (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28).

Actividad anti-VIH-1 y toxicidad celular. La metodología utilizada para realizar y analizar estos experimentos se ha descrito previamente (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Gonzalez-Bulnes et al., Angewandte Chemie-International Edition 52(50) (2013) 13405-13409). Brevemente, se obtuvieron sobrenadantes infecciosos a partir de la transfección de células 293T con el plásmido pNL4.3-Ren. Se infectaron células MT-2 con estos sobrenadantes en presencia de los compuestos, y la cuantificación de la actividad anti-VIH se realizó 48 h después de la infección determinando actividad luciferasa en lisados celulares. La viabilidad celular se evaluó en células tratadas con las mismas concentraciones de compuestos utilizando el ensayo CellTiterGlo (Promega). Los resultados de actividad antiviral y la toxicidad celular representan el promedio de al menos tres experimentos independientes.

Ensayos de transfección celular. Se transfectaron células MT-2 con plásmidos que contenían un gen reportero de luciferasa cuya expresión estaba bajo el control del VIH-1 completo (NL4.3-luc) o del promotor LTR de VIH-1 (LTR-Luc). Después de la transfección, las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto, y 48 h más tarde se cuantificó la actividad luciferasa en los lisados celulares (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28; Gonzalez-Bulnes et al., Angewandte Chemie-International Edition 52(50) (2013) 13405-13409).

Análisis del procesamiento de ARN del VIH-1. Se transfectaron células MT-2,

previamente tratadas durante 72 o 96 horas con dos concentraciones diferentes (5 y 10 μM) de compuesto **1a** o **2a**, con un plásmido pNL4.3. A continuación se aisló el ARN celular total, se trató con DNasa I y se retrotranscribió tal como se describe en el estado de la técnica (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28). Los transcritos de ARN de VIH-1 sin procesar, semiprosados y completamente procesados se cuantificaron por qPCR en relación con un control obtenido sin tratamiento, usando los cebadores descritos por Mohammadi et al. (PLoS Pathog 9(1) (2013) e1003161), y GAPDH como control endógeno.

10 **Resultados**

Inhibición de la interacción entre el subdominio IIB de RRE y Rev₃₄₋₅₀, e inhibición del complejo completo RRE-Rev

La capacidad de los compuestos de inhibir la interacción IIB-Rev₃₄₋₅₀ se evaluó mediante un ensayo basado en la detección mediante anisotropía de fluorescencia (FA) del desplazamiento de un péptido Rev₃₄₋₅₀ etiquetado con FITC de su sitio de unión en el subdominio IIB RRE. La capacidad de los compuestos de inhibir la formación del complejo RRE-Rev se evaluó mediante un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Se encontró que los compuestos **1a**, **2a** y **2b** interfieren tanto con la interacción IIB-Rev₃₄₋₅₀ como con la formación del complejo RRE-Rev completo (Tabla 1, Figura 2). El compuesto más potente fue **2a** (con IC_{50} entre 4,7 y 4,8 μM en ambos experimentos FA y EMSA), seguido de **2b** (10,3-13,7 μM). El aumento de las concentraciones de estos dos compuestos aumentó la intensidad de la banda correspondiente a RRE libre en los ensayos EMSA. Esto indica la inhibición del complejo RRE-Rev de longitud completa, que típicamente presenta varias bandas electroforéticas correspondientes a complejos con diferente número de monómeros Rev asociados (Figura 2b). El compuesto **1a** bloqueó la interacción entre el subdominio IIB y Rev₃₄₋₅₀ con una IC_{50} 6,7 μM , y promovió la formación de complejos RRE-Rev con un peso molecular inusual a concentraciones superiores a 10 μM (Figura 2b).

Tabla1

Compuesto ^a	IC_{50} IIB-Rev ₃₄₋₅₀ ($\text{M} \cdot 10^6$)	IC_{50} RRE-Rev ($\text{M} \cdot 10^6$)
1a	6,7 (4,2-10,5; 0.8398)	^b

2a (referencia)	4,8 (3,2-7,1; 0,8910)	4,7 (2,2-7,3; 0,9156)
2b (referencia)	10,3 (9,2-11,5; 0,9843)	13,7 (5,6-21,8; 0,9270)

^a Los valores de IC_{50} IIB_h-Rev₃₄₋₅₀ se obtuvieron mediante experimentos FA utilizando 60 nM IIB_h y 10 nM frevp, y los valores de IC_{50} RRE-Rev se midieron mediante EMSA con 78 nM RRE y 1.32 μ M Rev. La tabla muestra los valores IC_{50} obtenidos mediante dos (EMSA) o tres (FA) experimentos independientes; entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza del 95% y los coeficientes R^2 .

^b A concentraciones ≥ 10 μ M, **1a** indujo una acumulación inusual de complejos RRE-Rev de peso molecular intermedio en lugar de RRE libre. Esto impidió la determinación del valor IC_{50} RRE-Rev.

10 Propiedades de unión a ARN

Para comprobar si los compuestos inhiben la interacción entre RRE y Rev uniéndose al ARN RRE, se midió asociación al subdominio IIB de RRE con experimentos de intensidad de fluorescencia, usando las secuencias de ARN IIBh-19ap o IIBh-23fl que contenían sondas de 2-amino purina y fluoresceína en los residuos desapareados A19 y U23 del bucle IIB, respectivamente (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28) (Figura 3). La especificidad de la interacción se evaluó duplicando los experimentos en presencia de un exceso molar de 100 veces de ARNtCys. Asimismo, evaluamos la especificidad relativa a ADN bicatenario realizando adicionalmente los experimentos con un exceso molar de 100 veces de un dúplex de ADN de 26 pares de bases (identificado como LTRd) que contiene sitios de unión de factores de transcripción NF- κ B y Sp-1 (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28). Estos dos factores se unen al promotor LTR del ADN del VIH-1 y son esenciales para la replicación del virus (Jones et al., Annu Rev Biochem 63 (1994) 717-43).

Todos los compuestos **1a**, **2a** y **2b** se asociaron al subdominio IIB de RRE del ARN. El compuesto que se unió de forma más potente fue **1a** con una K_d de 1,4 μ M, seguido de **2a** y **2b** (10,8-12,1 μ M) (Tabla 2, Figura 3). La interacción fue específica para **2a** y **2b**, como lo indican las curvas de unión obtenidas en presencia de un exceso molar de 100 veces de ARNtCys o LTRd. El compuesto **1a** exhibió especificidad moderada.

30 Tabla 2

<i>Comp.^a</i>	$K_d(IIB_h)$ ($M \cdot 10^6$)	$K_d(IIB_h + tRNA)$ ($M \cdot 10^6$)	<i>especificidad IIB/RNA</i> $\frac{K_d(IIB_h)}{K_d(IIB_h + tRNA)}$	$K_d(IIB_h + LTR_d)$ ($M \cdot 10^6$)	<i>especificidad IIB/DNA</i> $\frac{K_d(IIB_h)}{K_d(IIB_h + LTR_d)}$
1a	1,4 (1,0-1,8; 0,9849)	2,4 (1,5-3,2; 0,9830)	0,58	2,8 (1,7-3,9; 0,9812)	0,50
2a (referencia)	10,8 (1,6-20,0; 0,9529)	9,0 (5,2-12,9; 0,9055)	1,20	9,2 (5,9-12,5; 0,9397)	1,17
2b (referencia)	12,1 (6,0-18,1; 0,8841)	11,4 (0,8-21,9; 0,9547)	1,06	10,2 (7,2-13,2; 0,9598)	1,19

^a Para cada compuesto, la tabla muestra constantes de equilibrio de disociación de IIBh (K_d) en ausencia (IIB_h) y presencia de ARNtCys ($IIB_h + tRNA$) o dúplex de ADN LTRd ($IIB_h + LTR_d$). La especificidad de la interacción se cuantificó calculando los cocientes $K_d(IIB_h)/K_d(IIB_h + tRNA)$ y $K_d(IIB_h)/K_d(IIB_h + LTR_d)$. Las interacciones con relaciones de especificidad cercanas a 1 o > 1 son específicas, mientras que aquellas con relaciones $<< 1$ son inespecíficas. Todos los compuestos se analizaron usando IIB_h -19ap. La tabla muestra los valores de K_d obtenidos con dos experimentos independientes; entre paréntesis se indican los intervalos de confianza del 95% y los coeficientes R^2 .

- 10 Posteriormente, utilizamos espectroscopía de RMN para identificar los sitios de unión en la horquilla IIB_h de los compuestos. Los resultados de RMN fueron consistentes con las observaciones de fluorescencia: **1a**, que mostró mayor afinidad por IIB_h en el ensayo de fluorescencia, ensanchó o alteró el desplazamiento químico de las resonancias de IIB_h a bajas relaciones molares de fármaco:ARN. Este compuesto alteró las señales de los
- 15 residuos C_9 , A_{19} , C_{20} y U_{23} que comprenden el sitio de unión Rev, pero también perturbó las señales de los tallos de doble hélice que flanquean el bucle. **2a** y **2b** requirieron una relación molar fármaco:ARN mayor para inducir cambios en las señales de ARN IIB_h . La unión de **2a** afectó las señales de residuos situados en los tallos que flanquean el bucle interno, mientras que **2b**, el compuesto que presentó una mayor K_d en el ensayo de
- 20 fluorescencia, únicamente indujo ensanchamiento de señales del residuo U_{23} del bucle a una relación molar fármaco:ARN elevada.

Actividad antirretroviral y toxicidad celular

- Los compuestos **1a**, **2a** y **2b** resultaron tener actividad antirretroviral en un ensayo de
- 25 infección celular. El inhibidor más potente fue **1a**, con un valor submicromolar de EC_{50} (830 nM), seguido de **2a** ($EC_{50} = 2,0 \mu M$) y **2b** ($EC_{50} = 10,2 \mu M$) (Tabla 3 y Figura 4a).

Las concentraciones citotóxicas de los compuestos también se midieron y se compararon con las concentraciones antivirales obtenidas en los experimentos de infección. Los valores de CC_{50} fueron 34, 22 y > 10 veces superiores a las concentraciones antivirales para **1a**, **2a** y **2b** (Tabla 3 y Figura 4a).

5

Tabla 3

<i>Comp.^a</i>	<i>EC₅₀ infección, VIH (M·10⁶)</i>	<i>EC₅₀ transfección, VIH (M·10⁶)</i>	<i>EC₅₀ transfección, LTR (M·10⁶)</i>	<i>CC₅₀ (M·10⁶)</i>
1a	0,83 (0,58-1,2; 0,9707)	2,5 (1,2-4,3; 0,5344)	$>12,5 < 25$	28,1 (12,0-65,7; 0,9124)
2a (referencia)	2,0 (1,5-2,6; 0,9809)	3,3 (1,3-6,7; 0,4484)	4,4 (3,4-5,8; 0,9323)	43,9 (11,5-168; 0,7333)
2b (referencia)	10,2 (5,9-17,6; 0,9193)	>100	n/d	>100

^a Entre paréntesis se indican los intervalos de confianza y los coeficientes R^2 ; n/d: no determinado

10 Ubicación de las dianas antivirales

Con el objetivo de identificar la diana, o conjunto de dianas, de los compuestos ensayados, realizamos un ensayo basado en la transfección de un vector VIH-1 de longitud completa. En este experimento, se evitan las fases de entrada, transcripción inversa e integración de ADN del ciclo del virus, de modo que sólo se producen eventos transcripcionales o postranscripcionales susceptibles de ser bloqueados por el inhibidor en estudio. Cuando los compuestos se evaluaron con este ensayo de transfección, los compuestos **1a** y **2a** mostraron valores de EC_{50} bajos que oscilaban entre 2,5 y 3,3 μM (Tabla 3 y Figura 4b). Este resultado indicó que estos compuestos actúan en procesos transcripcionales o post-transcripcionales del ciclo del virus. Por el contrario, **2b** resultó ser inactivo en el ensayo de transfección a concentraciones inferiores a 100 μM . Dado que este compuesto tuvo un valor de EC_{50} de 10,2 μM en el experimento de infección, este resultado sugiere que **2b** actúa principalmente en los procesos pre-transcripcionales del ciclo del virus en un contexto celular.

25 Inhibición de la transcripción del VIH-1 y la función de Rev

La ribonucleoproteína RRE-Rev permite el transporte de transcritos víricos no procesados o parcialmente procesados al citoplasma, un proceso post-transcripcional esencial

requerido por el virus para completar su ciclo de replicación. Los compuestos **1a** y **2a** alteraron las interacciones IIB-Rev₃₄₋₅₀ y RRE-Rev de longitud completa a bajas concentraciones (Tabla 1 y Figura 2), reconocieron el subdominio IIB de RRE con especificidad alta o moderada en experimentos de fluorescencia (Tabla 2 y Figura 3), y exhibieron valores de EC₅₀ más bajos en el ensayo de transfección de VIH-1 (Tabla 3 y Figura 4b). Por el contrario, el compuesto **2b** inhibió los complejos IIB-Rev₃₄₋₅₀ y RRE-Rev a concentraciones más altas, se unió al subdominio IIB de RRE con menor afinidad (Tablas 1 y 2 y Figura 3), y tuvo menos actividad en el ensayo de transfección del VIH-1 (Tabla 3 y Figura 4b).

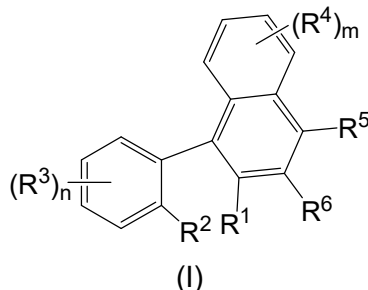
El mecanismo antiviral de los compuestos **1a** y **2a** se exploró con ensayos celulares adicionales. Primero se evaluó si tenían un efecto sobre la transcripción viral mediante la determinación de su actividad inhibidora en un experimento basado en la transfección de un plásmido que codifica un gen de luciferasa cuya expresión depende del promotor LTR del virus (Hazan et al., Proc Natl Acad Sci USA 87(20) (1990) 7861-5). **1a** mostró una inhibición más débil de la expresión dependiente de LTR en relación con la actividad detectada en el ensayo de transfección de VIH-1 completo, mientras que **2a** inhibió la expresión dependiente de LTR con un valor de EC₅₀ similar a los medidos en los experimentos de infección y transfección de VIH-1 (Tabla 3). Estos resultados sugieren que si bien la actividad antiviral de **1a** es independiente de la transcripción dependiente de LTR, el efecto de **2a** podría deberse a la inhibición de la transcripción mediada por LTR.

A continuación se comprobó si los compuestos **1a** y **2a** actuaban en el sistema RRE-Rev en un contexto celular. Después de transfectar las células con un vector proviral de longitud completa, las cantidades de transcritos de ARN del VIH-1 sin procesar, semiprosesados y completamente procesados se cuantificaron mediante RT-qPCR en ausencia y presencia de cada compuesto (Prado et al., Biochem Pharmacol 107 (2016) 14-28). Puesto que Rev indirectamente desfavorece el proceso de corte y empalme al transportar transcritos víricos no procesados o semiprosesados del núcleo al citoplasma, el bloqueo del sistema RRE-Rev debería aumentar los niveles de especies completamente procesadas y reducir la cantidad de transcritos de VIH-1 sin procesar o semiprosesados. Este efecto se observó claramente cuando se expusieron las células al compuesto **1a** a concentraciones de 5 y 10 µM (Figura 5). También se detectó una reducción significativa en los niveles de transcritos virales en relación con las células no tratadas en presencia de este inhibidor. Por el contrario, la misma concentración de **2a** no

indujo cambios claros en los patrones de transcritos víricos no procesados frente a procesados, y redujo la cantidad de transcritos virales en menor grado con respecto a **1a**.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



o una sal o solvato del mismo, donde

- R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR' , $OC(O)R'$, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o

R^1 y R^2 forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un carbociclo o heterociclo de 5 miembros;

- cada R^3 y R^4 se selecciona independientemente de halógeno, $OC(O)R'$, SOR' , SO_2R' , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN, NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o dos grupos R^3 o R^4 contiguos forman un anillo de benceno;

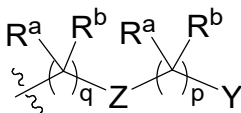
- R^5 se selecciona de H, halógeno, $OC(O)R'$, SOR' , SO_2R' , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN, NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

- R^6 se selecciona de H, halógeno, $OC(O)R'$, SOR' , SO_2R' , $C(O)R'$, $C(O)OR'$, CN, NO_2 , alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos y un grupo de fórmula (A), donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de

5 a 10 miembros:

- n representa 0, 1, 2, 3, o 4; y
- m representa 0, 1, 2, 3, o 4;

donde al menos uno de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es un grupo de fórmula (A)



(A)

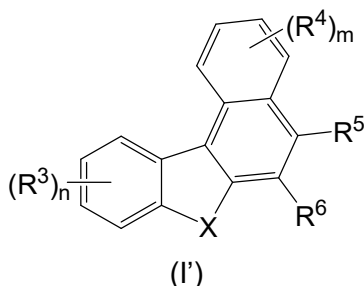
donde

- Z se selecciona de heterociclilo de 5 a 10 miembros, O, S y NR', donde R' representa H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', NR'₂, C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- Y se selecciona de H, OR', OC(O)R', NR'₂, *NR'₃, C(O)R', C(O)OR', OC(O)NR'₂, C(O)NR'₂, SR', SOR', SO₂R', cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₂ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y
- q representa 0, 1, 2 o 3;

para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN.

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el virus ARN se selecciona de virus VIH-1, virus VIH-2, virus del síndrome respiratorio severo agudo, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, poliovirus, virus de la gripe, virus del Ébola, virus parainfluenza, rotavirus, virus chikungunya, virus de la rubeola, virus del sarampión.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde el virus ARN es VIH-1.

4. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (I')



5 o una sal o solvato del mismo, donde

- X se selecciona de O, S, NR⁷ y C(R⁸)(R⁹), donde

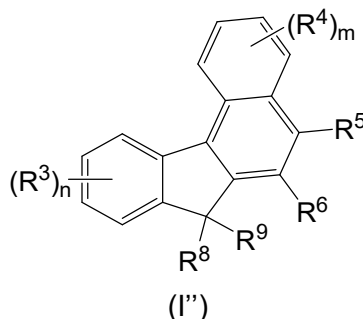
R⁷ se selecciona de H, C(O)R', C(O)OR', alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o

R⁸ y R⁹ forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo C=O;

- R³, R⁴, R⁵, R⁶, n y m son como se han definido en la reivindicación 1.

5. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (I'')



o una sal o solvato del mismo, donde

- R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituidos, donde R' se

selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros; o

R⁸ y R⁹ forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo C=O;

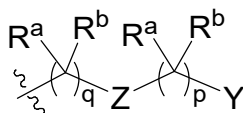
- R³, R⁴, R⁵, R⁶, n y m son como se han definido en la reivindicación 1.

5

6. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R⁸ y R⁹ forman, junto con el átomo de carbono al que están unidos, un grupo C=O.

7. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R⁵ es un grupo de fórmula (A)

10



(A)

donde

- Z se selecciona de heterociclilo de 5 a 10 miembros, O, S y NR', donde R' representa H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;

15

- cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, halógeno, OR', OC(O)R', NR'₂, C(O)R', C(O)OR', CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

20

- Y se selecciona de H, OR', OC(O)R', NR'₂, *NR'₃, C(O)R', C(O)OR', OC(O)NR'₂, C(O)NR'₂, SR', SOR', SO₂R' y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de 5 a 10 miembros;

25

- p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y
- q representa 0, 1, 2 o 3.

8. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, donde

30

- Z se selecciona de heterociclilo de 5 a 10 miembros, O, S y NR', donde R' representa H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) o heterociclilo de 5 a 10 miembros;
- cada R^a y R^b se selecciona independientemente de H, halógeno, OH, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₂, aril(C₆₋₁₂)alquilo(C₁₋₆) y heterociclilo de

5 a 10 miembros;

- Y se selecciona de NR'_2 , $^+\text{NR}'_3$, OR' , $\text{OC(O)NR}'_2$, $\text{C(O)NR}'_2$ y heterociclilo de 5 a 10 miembros, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , haloalquilo C_{1-6} , arilo C_{6-12} , aril(C_{6-12})alquilo(C_{1-6}) y heterociclilo de

5 a 10 miembros;

- p representa 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y
- q representa 0, 1, 2 o 3.

9. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde q es 0.

10. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde R^a y R^b son H.

11. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde n y m se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2, preferiblemente de 0 y 1.

12. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde n y m son 0.

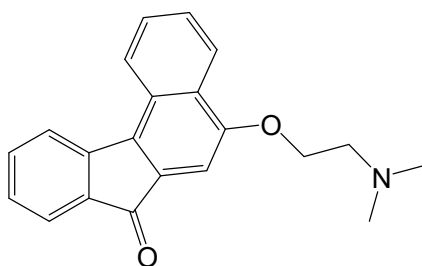
13. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde cada R^3 y R^4 se selecciona independientemente de halógeno, OH, OR' , alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} , donde R' se selecciona de alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ; o dos grupos R^3 o R^4 contiguos forman un anillo de benceno.

14. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde R^6 se selecciona de H, halógeno, OH, OR' , NR'_2 , alquilo C_{1-6} y haloalquilo, donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} .

15. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde R^6 es H.

16. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde n y m son 0 y R^6 es H.

17. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el compuesto de fórmula (I) es



o una sal o un solvato del mismo.

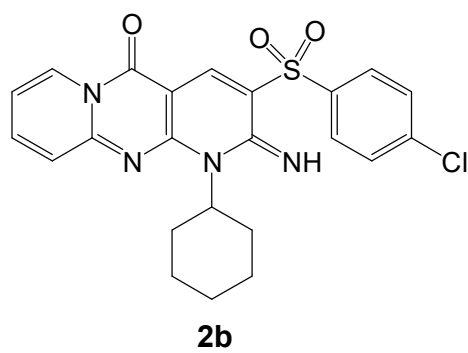
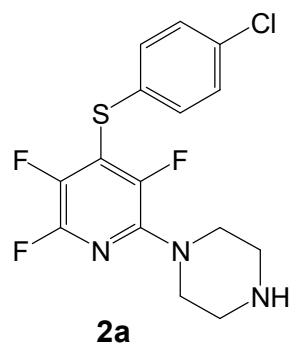
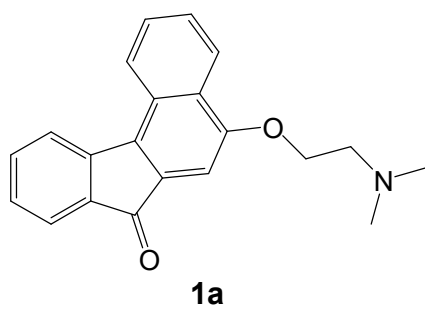


Fig. 1

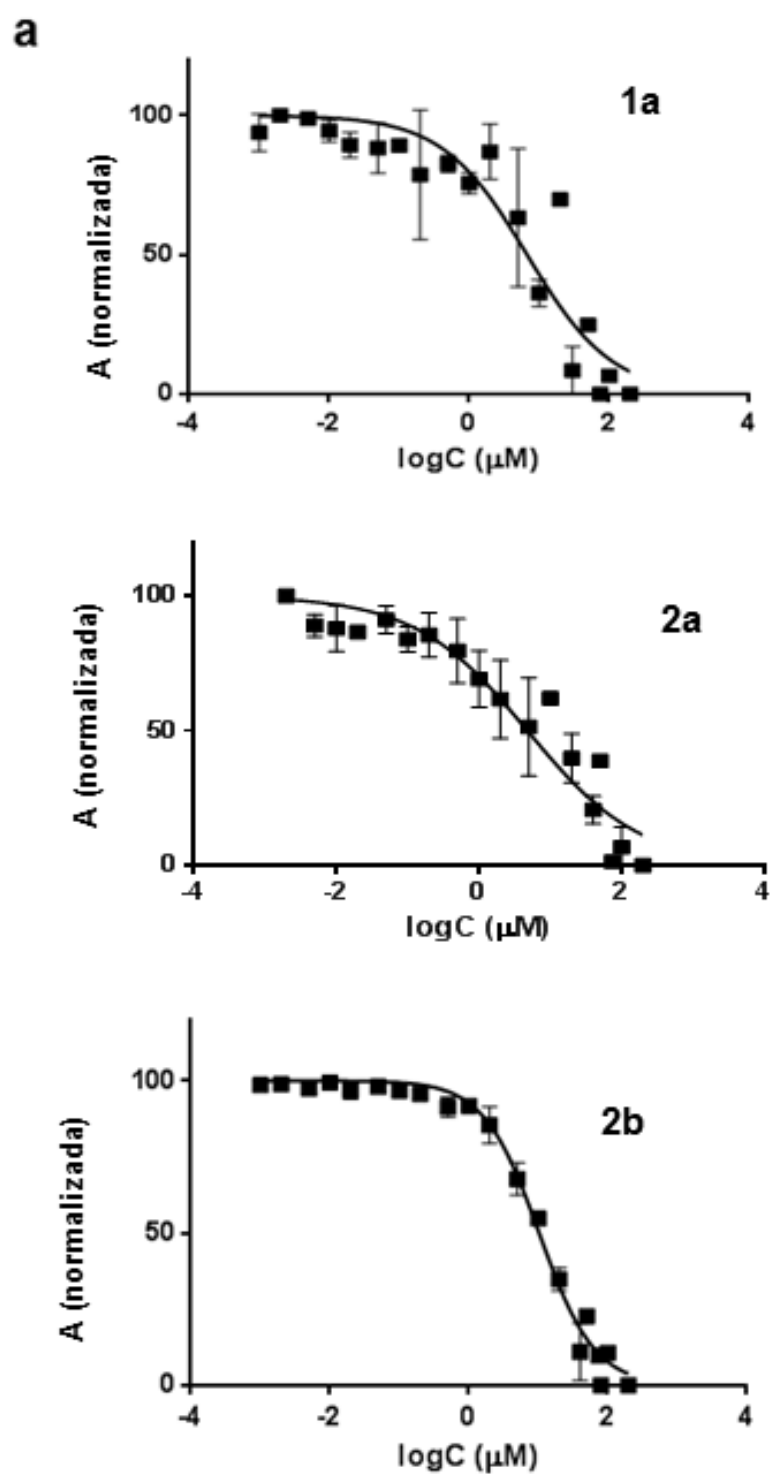


Fig. 2

b

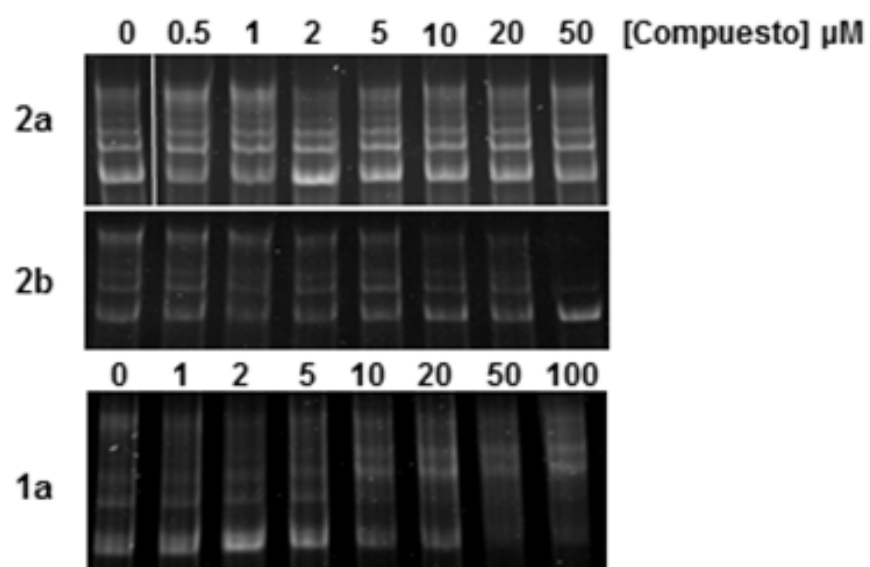


Fig. 2 (cont.)

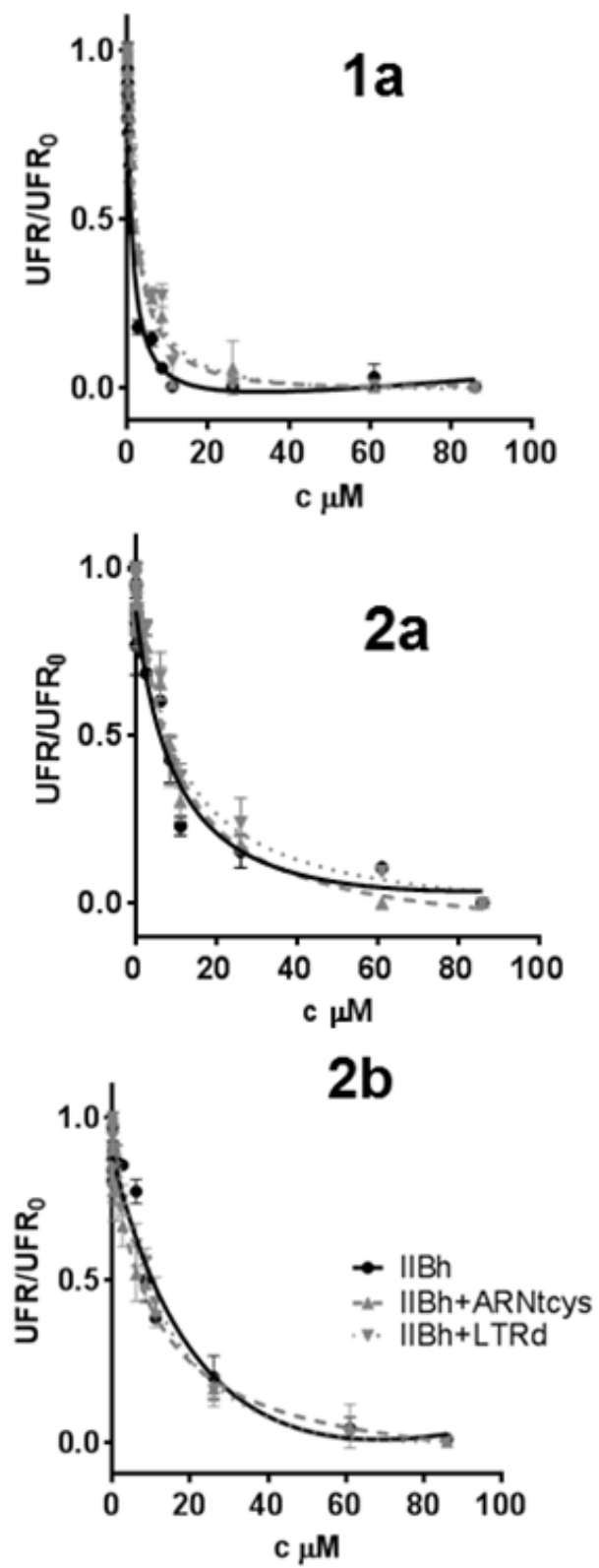
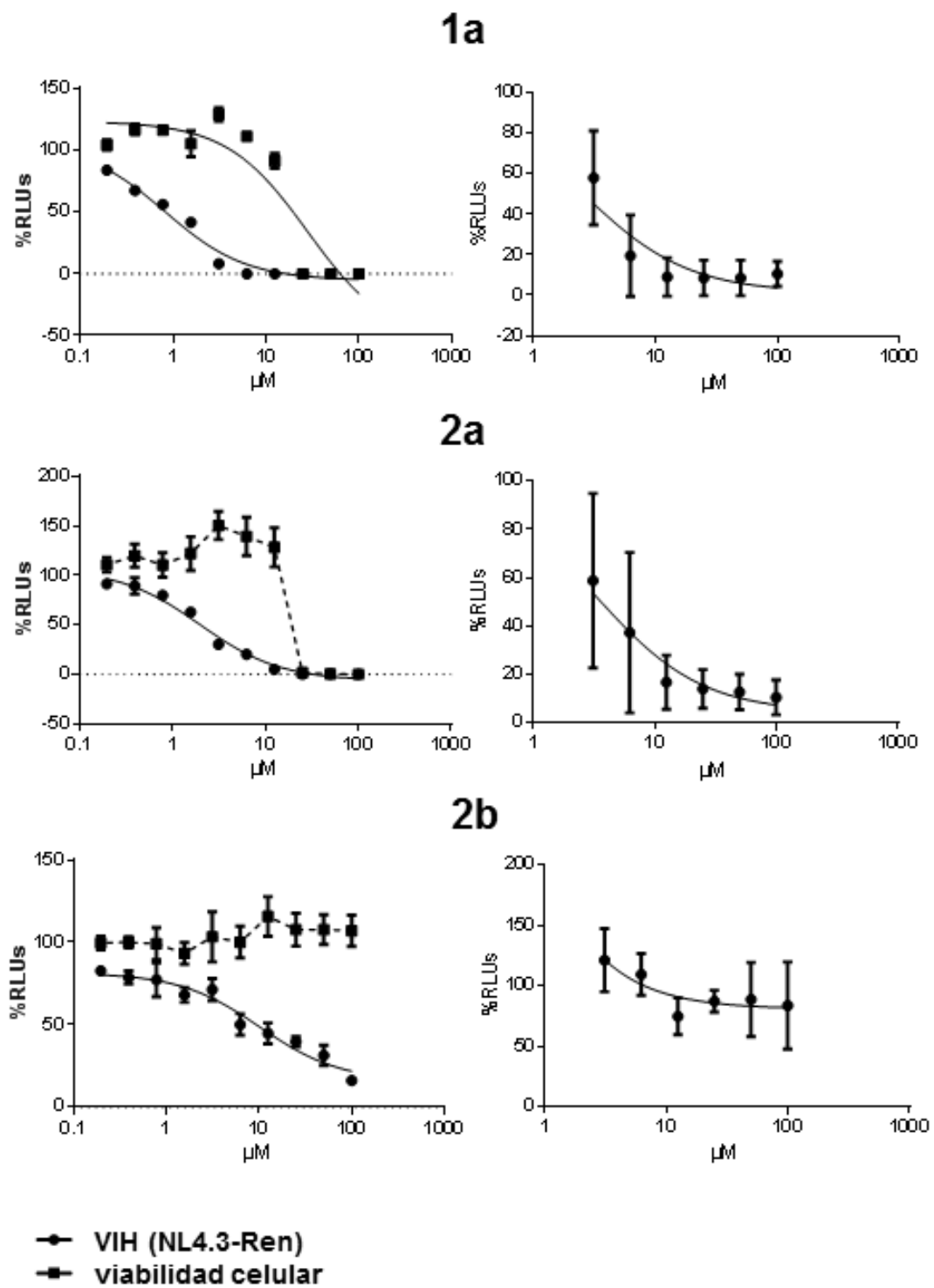


Fig. 3



a

b

Fig. 4

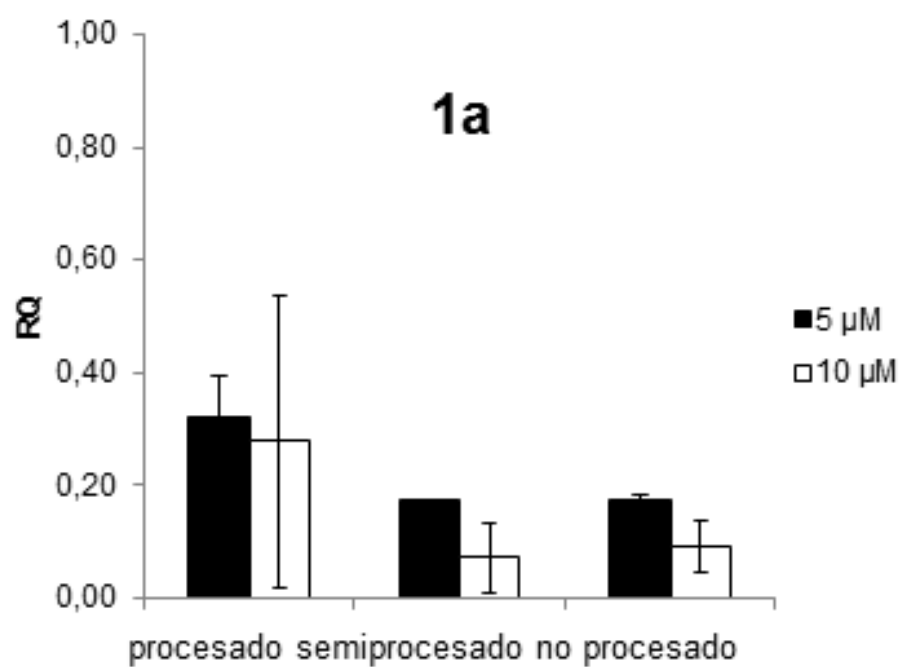


Fig. 5