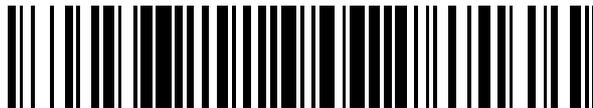


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 815**

21 Número de solicitud: 201330235

51 Int. Cl.:

C07C 217/60 (2006.01)

C07C 213/08 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.09.2014

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
(25.0%)**

Carrer d'Eduardo Primo Yúfera, 5

46012 Valencia ES;

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (25.0%);

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA "SAN

VICENTE MÁRTIR" (25.0%) y

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (25.0%)

72 Inventor/es:

GALLEGO SALA, José;

GONZÁLEZ BULNES, Luis;

FUSTERO LARDIÉS, Santos;

IBÁÑEZ SÁNCHEZ, Ignacio;

CATALÁN MUÑOZ, Silvia y

ALCAMÍ PERTEJO, José

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

54 Título: **Nuevos p-terfenilos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y otras enfermedades**

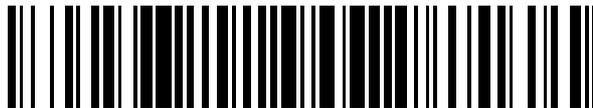
ES 2 489 815 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 815**

21 Número de solicitud: 201330235

57 Resumen:

Nuevos p-terfenilos hexakis-sustituídos con grupos bilaterales para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y otras enfermedades.

La invención consiste en nuevos compuestos p-terfenilos hexakis-sustituídos con grupos bilaterales y composiciones farmacéuticas que los contengan con utilidad como agentes farmacéuticos.

Debido a su capacidad de interactuar con un bucle interno de ARN y de mimetizar una α - hélice proteica, estos compuestos son efectivos especialmente en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) así como otras enfermedades, tales como enfermedades causadas por otros virus ARN, enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser usados para modular la función de bucles internos de ARN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser utilizados como agonistas o inhibidores de dominios proteicos de α - hélice en interacción con otras biomoléculas.

ES 2 489 815 A1

**NUEVOS p-TERFENILOS HEXAKIS-SUSTITUIDOS CON GRUPOS BILATERALES PARA
EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 (VIH-1) Y OTRAS ENFERMEDADES**

5 **DESCRIPCIÓN**

SECTOR DE LA TECNICA

La invención consiste en nuevos compuestos p-terfenilos hexakis-sustituidos con grupos
10 bilaterales y composiciones farmacéuticas que los contengan con utilidad como agentes
farmacéuticos.

Debido a su capacidad de interactuar con un bucle interno de ARN y de mimetizar una α -
hélice proteica, estos compuestos son efectivos especialmente en el tratamiento de la
15 infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) así como otras
enfermedades, tales como enfermedades causadas por otros virus ARN, enfermedades
infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser usados para modular la función
de bucles internos de ARN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos
20 puedan ser utilizados como agonistas o inhibidores de dominios proteicos de α -hélice en
interacción con otras biomoléculas.

ESTADO DE LA TECNICA

Según el informe 2011 de la Organización Mundial de la Salud sobre la respuesta
25 internacional al SIDA, en 2010 la infección por VIH afectó a 34 millones de personas en todo
el mundo, causando 2,7 millones de nuevos casos y 1,8 millones de muertes.

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
30 bloquean su entrada en la célula. Sin embargo, esta terapia no elimina la infección^{1,2}. 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.

El ARN desempeña un papel central en el funcionamiento de los seres vivos³, 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 función⁴.

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 interactúan 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^{4,5}. Para que esta estrategia tenga éxito, es imperativo identificar nuevos esqueletos químicos y nuevos mecanismos de reconocimiento específico de ARN estructurado.

El elemento de reconocimiento de Rev (RRE) es una estructura fuertemente conservada de 350 nucleótidos localizada en el gen *env* del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Dentro del subdominio IIB del RRE, el surco mayor inusualmente ensanchado de un bucle interno GGCG:ACGGUA forma un complejo de alta afinidad⁶ con la α -hélice rica en argininas de Rev (Fig. 1, a), una proteína tipo hélice-vuelta-hélice formada por 116 aminoácidos y codificada por el virus^{7,8}. Esta interacción inicial entre el bucle interno IIB y la α -hélice de unión a ARN de Rev (designada en lo sucesivo como Rev₃₄₋₅₀) es esencial para la viabilidad del virus, ya que dispara una cascada de eventos que permiten el transporte de moléculas no procesadas de ARN viral al citoplasma de la célula infectada en la fase tardía del ciclo viral⁹. Estos eventos incluyen la incorporación de moléculas adicionales de Rev al

complejo¹⁰ a través de contactos hélice-hélice e interacciones con otros sitios del RRE⁷, y la asociación de la ribonucleoproteína RRE-Rev al factor de transporte celular Crm1⁷.

5 Diversos trabajos publicados en los últimos años indican que Rev tiene efectos pleiotrópicos¹¹: además de transportar el ARN viral al citoplasma, esta proteína promueve la traducción y el empaquetamiento del ARN viral^{11 12} e interfiere con la integración del cDNA viral en el genoma de la célula hospedadora¹². Claramente, Rev representa una importante diana para la terapia anti-VIH-1.

10 La presente invención comprende el diseño *in silico* y la síntesis orgánica de compuestos *para*-terfenílicos hexakis-sustituídos con grupos bilaterales. La introducción de sustituyentes en *orto* y a ambos lados de un esqueleto *p*-terfenílico asegura una proyección de cadenas laterales en un abanico de 360° en el espacio, de manera similar a lo observado en el complejo de alta afinidad entre la α -hélice de Rev y RRE, donde dos tercios de la proteína
15 están rodeados por ARN. Esta conformación, junto a su composición química, permite a los compuestos unirse de manera específica al bucle interno IIB del ARN RRE del virus VIH-1. La invención contiene la confirmación, mediante experimentos *in vitro*, de que estos *p*-terfenilos hexakis-sustituídos efectivamente reconocen este bucle mimetizando la α -hélice de unión a ARN de Rev, siendo capaces de inhibir la interacción entre RRE y Rev₃₄₋₅₀.
20 Asimismo, la invención describe ensayos celulares que demuestran que los inhibidores más potentes bloquean la replicación del virus VIH-1 *in vivo*, y ejercen este efecto en las fases pos-transcripcionales del ciclo de vida del virus.

Los compuestos descritos en esta invención actúan sobre el sistema RRE-Rev viral, una
25 diana terapéutica esencial para la replicación del VIH-1 que hasta el momento no ha sido explotada. Las moléculas se basan en un esqueleto orgánico de estructura novedosa, no antibiótico y no peptídico, diseñado para reconocer una estructura de ARN viral fuertemente conservada. Por este motivo, la aparición de resistencias a este tipo de compuestos podría ser más lenta que la observada para los compuestos actualmente usados en clínica, que
30 actúan sobre dianas proteicas menos conservadas. Además, RRE y Rev están codificados por el virus y ningún factor celular interviene en la interacción RRE-Rev. Por tanto, los inhibidores RRE-Rev pueden bloquear la replicación del virus VIH-1 con menores efectos en componentes celulares y por ende menor toxicidad.

La solicitud de patente americana US2005/0215563 hace referencia a una amplia familia de compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con o receptivas de la inhibición de la interacción entre una α -hélice proteica y otra proteína o sitio de unión. Entre otras dianas, la solicitud extiende la aplicación de los compuestos hacia posibles
5 tratamientos contra infecciones causadas por HIV-1, citando en particular la inhibición de la proteína gp41 para bloquear la entrada del virus en la célula y, de manera mucho más indirecta, una hipotética inhibición de la proteína Rev. La figura 14 de la solicitud US2005/0215563 describe diversos compuestos con actividad inhibitoria gp41. Estos compuestos son conceptualmente y estructuralmente diferentes de los compuestos p-
10 terfenílicos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales descritos en la presente invención.

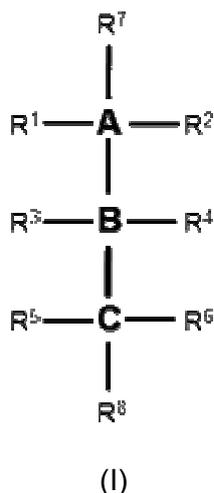
Por tanto, la presente invención aporta nuevos compuestos p-terfenilos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales farmacológicamente activos, representados por la fórmula general I, para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus VIH-1. Debido a su
15 capacidad de interactuar con un bucle interno de ARN y de mimetizar una α -hélice proteica, estos compuestos también pueden ser activos para tratar otras enfermedades, tales como enfermedades causadas por otros virus ARN, enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser usados para modular la función de bucles internos de ARN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan
20 ser utilizados como agonistas o inhibidores de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25 La invención proporciona nuevos compuestos *para*-terfenílicos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales y composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos definidos por la Fórmula (I) para su uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y/o otras enfermedades causadas por otros virus ARN, enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la modulación de la
30 función de bucles internos de ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la inhibición o mimetismo de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

Los compuestos de la presente invención son capaces de unirse al bucle interno IIB del ARN RRE del virus VIH-1, inhibir la interacción entre RRE y Rev₃₄₋₅₀, y bloquear la replicación del virus VIH-1 sin mostrar toxicidad celular a las concentraciones evaluadas.

5 Los compuestos de la presente invención están representados por la siguiente Fórmula (I):



10 donde:

A, B y C representan independientemente uno del otro anillos de seis átomos seleccionados del grupo que consiste en benceno, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, ciclohexano, oxano, piperidina y piperazina,

15

los anillos de seis átomos A, B y C están unidos en *para* mediante enlaces simples,

los sustituyentes R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ ocupan posiciones *orto* o *meta* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

20

los sustituyentes R⁷ y R⁸ ocupan posiciones *para* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

R¹ y R² ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el
 25 anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo

consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

5 R^3 y R^4 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

10 R^5 y R^6 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo, y

15 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, alquilo, aril alcoxi y aril éster.

20 El término “alquilo” o “alquil”, según se utiliza en la presente memoria, comprende hidrocarburos que contienen de 1 a 12 átomos de carbono, cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos con diferentes grupos funcionales, como por ejemplo metilo, hexilo, isopropilo, propenilo, etc.

25 El término “halo” o “halógeno”, según se utiliza en la presente memoria, comprende flúor, cloro, bromo y yodo.

30 El término “alcoxi”, según se utiliza en la presente memoria, comprende hidrocarburos de 1 a 12 átomos de carbono unidos a átomo de oxígeno. Los átomos de carbono podrán formar cadenas cíclicas o acíclicas, saturadas o insaturadas, ramificadas o no ramificadas, sustituidas o no sustituidas con diferentes grupos funcionales. Algunos ejemplos son metoxi, etoxi, ciclohexilmetoxi, morfolinmetoxi, etc.

El término “arilo”, según se utiliza en la presente memoria, comprende anillos aromáticos de 5 a 6 átomos que pueden ser carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, sustituidos o no

sustituidos con diferentes grupos funcionales en una o varias posiciones, como por ejemplo trifluorometilbenceno, piridina, tiofeno, etc.

Los compuestos preferidos de la presente invención se seleccionan de un grupo de
5 moléculas definidas por la Formula general (I), donde:

A, B y C son benceno,

R¹ y R² ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *meta*
10 respecto al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, substituidos o no substituidos,

R³ y R⁴ ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto
15 al carbono de su anillo unido al benceno A, y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, (C1-C6) alcoxi, (C1-C6) alquil amida substituida o no substituida, (C1-C6) alquil ester substituido o no substituido, (C1-C6) hidroxialquilo, (C1-C6) haloalquilo, (C1-C6) alcoxialquilo, y (C1-C8) alquilo,

R⁵ y R⁶ ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto
20 al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, substituidos o no substituidos, y

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en
25 hidrógeno, halógeno, hidroxilo, (C1-C10) alcoxi, (C1-C10) alquil amina, (C1-C10) alquil guanidina, (C1-C10) alquil amida, (C1-C10) alquil éster, (C1-C10) hidroxialquilo, (C1-C10) alcoxialquilo, (C1-C10) haloalquilo, (C1-C10) alquilo, aril alcoxi, y aril éster.

En concreto son compuestos preferidos de la presente invención:

- 30 JB-399: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
IIS-358: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',4''-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
IIS-311: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-478: 2,2',2'',2'''-(3',4-dimetoxi-4''-(4-(trifluorometil)bencil)oxi)-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetrail)tetraetilamina

IIS-530: 2,2',2'',2'''-(4''-(ciclohexilmetoxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetrail)tetraetilamina

5 IIS-420: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

IIS-375: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetrail)tetraetilamina

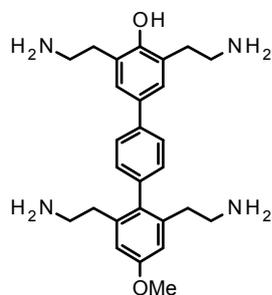
IIS-792: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2'-etil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

10 IIS-758: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3'-etil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetrail)tetraetilamina

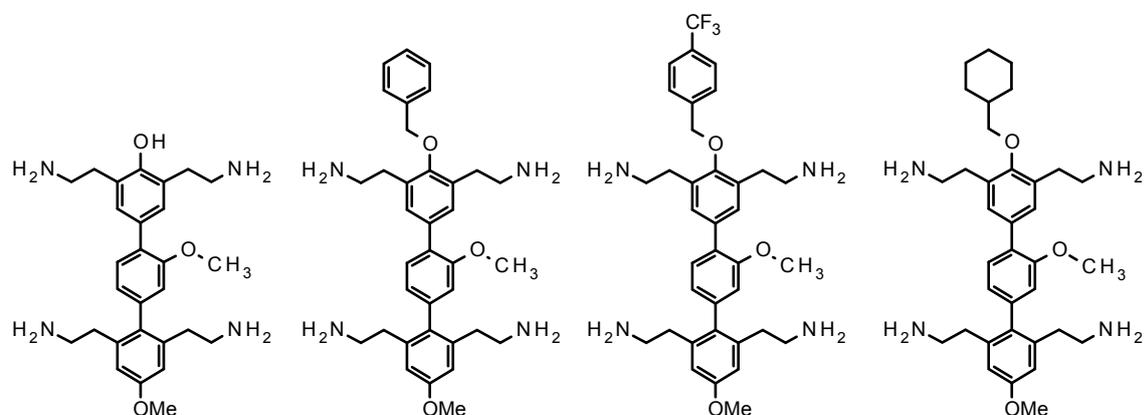
IIS-806: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

IIS-711: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetrail)tetraetilamina

15



JB-399

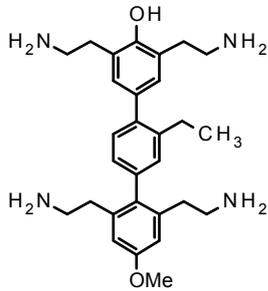


IIS-358

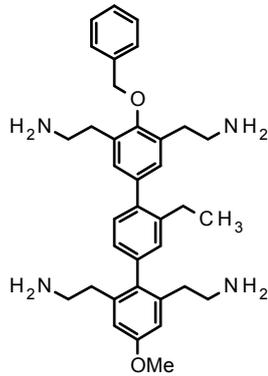
IIS-311

IIS-478

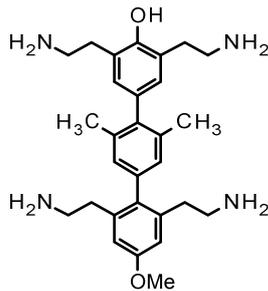
IIS-530



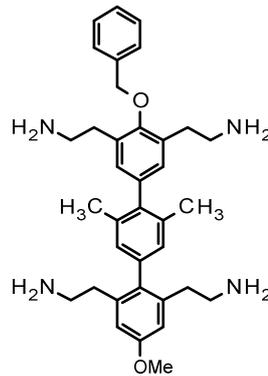
IIS-792



IIS-758

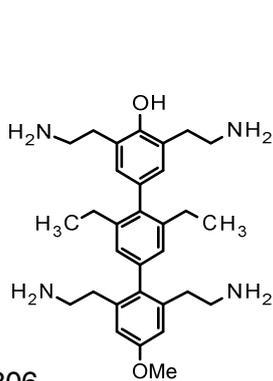


IIS-420

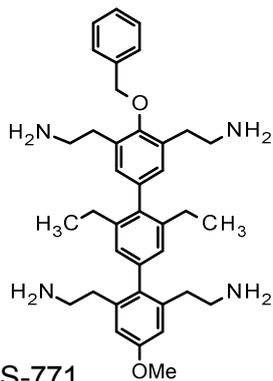


IIS-375

5



IIS-806



IIS-771

De entre ellos, los compuestos más preferidos de la presente invención son:

10

- IIS-806: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
- IIS-711: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina
- 5 IIS-420: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
- IIS-375: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1 representa (a) la estructura tridimensional del complejo formado por el bucle interno IIB del RRE y la α -hélice de unión a ARN de la proteína Rev, Rev₃₄₋₅₀⁶ y (b) una superposición de la conformación de mínima energía de un p-terfenilo hexakis-sustituido con grupos bilaterales sobre la α -hélice Rev₃₄₋₅₀. Ambos sistemas están orientados con sus ejes largos perpendiculares al plano del papel.

20

La Figura 2 representa un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la interacción entre un p-terfenilo con sustituciones bilaterales (IIS-478) y las horquillas de ARN RRE, RRE_c y TAR_c. Se muestran los sensogramas SPR (izquierda) y las curvas de unión en estado estacionario (derecha), para las interacciones RRE:IIS-478 (arriba), RRE_c:IIS-478 (en 25 medio) y TAR_c:IIS-478 (abajo), obtenidas a 25 °C y pH 7.4. Las concentraciones de ligando abarcaron un rango entre 0.1 y 100 μ M. Se fijaron cantidades similares de los tres ARN (aproximadamente 300 RUs) en los canales del *chip* SPR. Los parámetros de la interacción y los valores χ^2 del ajuste de las curvas se indican en los gráficos.

30 La Figura 3 representa espectros de RMN de varias interacciones representativas entre RRE y moléculas bifenílicas y terfenílicas. Se muestra la asignación de la región aromática H5-H6 de los espectros TOCSY (obtenidos a 27 °C con un tiempo de mezcla de 60 ms) correspondientes a las interacciones RRE:IIS-420, RRE:IIS-806 y RRE:JB-398. Los picos

cruzados H5-H6 de pirimidina están etiquetados con el nombre y número de residuo de la secuencia RRE (SEQ ID No.1). En todos los casos, el espectro de RRE libre (1:0) está superpuesto sobre los espectros de complejos con proporciones molares RRE:ligando crecientes.

5

La Figura 4 representa un modelo computacional apoyado en datos de RMN de un complejo entre RRE e IIS-311, construido a partir de la estructura tridimensional 1ETF⁶.

La Figura 5 representa curvas de inhibición de la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ por los terfenilos IIS-420 e IIS-375 y el antibiótico de referencia neomicina B, obtenidas mediante un ensayo de desplazamiento basado en anisotropía de fluorescencia. Los gráficos representan anisotropía normalizada en función del logaritmo de la concentración de compuesto (μM), e indican el valor R^2 del ajuste utilizado para obtener el valor IC_{50} de los compuestos. Los experimentos fueron realizados a 25°C y con 60 nM RRE y 10 nM frevp.

15

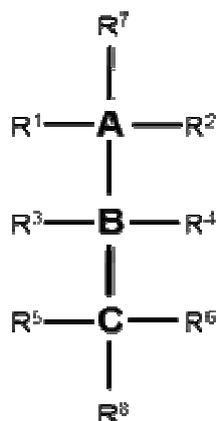
La Figura 6 representa ensayos celulares. (a) Ensayos anti-VIH-1 mostrando la actividad antiviral (NL4.3-Ren) y la viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. Los resultados se expresan como porcentaje de RLUs en el que el 100% representa infecciones con el vehículo utilizado para disolver los compuestos. (b) Ensayo post-integración. Los gráficos muestran la actividad de los compuestos activos en transfecciones de plásmidos luciferasa bajo el control del genoma completo del VIH-1 (NL4.3-Luc). Los resultados se expresan como porcentaje de RLUs en el que el 100% representa transfecciones con el vehículo utilizado para disolver los compuestos.

20

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención, compuestos p-terfenilos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales de Formula (I):

30



(I)

5 donde:

A, B y C representan independientemente uno del otro anillos de seis átomos seleccionados del grupo que consiste en benceno, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, ciclohexano, oxano, piperidina y piperazina,

10

los anillos de seis átomos A, B y C están unidos en *para* mediante enlaces simples,

los sustituyentes R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 ocupan posiciones *orto* o *meta* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

15

Los sustituyentes R^7 y R^8 ocupan posiciones *para* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

20 R^1 y R^2 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

25 R^3 y R^4 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo

consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

5 R⁵ y R⁶ ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo, y

10 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, alquilo, aril alcoxi y aril éster.

15 El término “alquilo” o “alquil”, según se utiliza en la presente memoria, comprende hidrocarburos que contienen de 1 a 12 átomos de carbono, cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos con diferentes grupos funcionales, como por ejemplo metilo, hexilo, isopropilo, propenilo, etc.

20 El término “halo” o “halógeno”, según se utiliza en la presente memoria, comprende flúor, cloro, bromo y yodo.

25 El término “alcoxi”, según se utiliza en la presente memoria, comprende hidrocarburos de 1 a 12 átomos de carbono unidos a átomo de oxígeno. Los átomos de carbono podrán formar cadenas cíclicas o acíclicas, saturadas o insaturadas, ramificadas o no ramificadas, sustituidas o no sustituidas con diferentes grupos funcionales. Algunos ejemplos son metoxi, etoxi, ciclohexilmetoxi, morfolinmetoxi, etc.

30 El término “arilo”, según se utiliza en la presente memoria, comprende anillos aromáticos de 5 a 6 átomos que pueden ser carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, sustituidos o no sustituidos con diferentes grupos funcionales en una o varias posiciones, como por ejemplo trifluorometilbenceno, piridina, tiofeno, etc.

En un aspecto preferente de la presente invención, se proporcionan compuestos definidos por la Fórmula general (I), donde:

A, B y C son benceno,

5

R¹ y R² ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *meta* respecto al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, sustituidos o no sustituidos,

10 R³ y R⁴ ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto al carbono de su anillo unido al benceno A, y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, (C1-C6) alcoxi, (C1-C6) alquil amida sustituida o no sustituida, (C1-C6) alquil ester sustituido o no sustituido, (C1-C6) hidroxialquilo, (C1-C6) haloalquilo, (C1-C6) alcoxialquilo, y (C1-C8) alquilo,

15

R⁵ y R⁶ ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, sustituidos o no sustituidos, y

20 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, (C1-C10) alcoxi, (C1-C10) alquil amina, (C1-C10) alquil guanidina, (C1-C10) alquil amida, (C1-C10) alquil éster, (C1-C10) hidroxialquilo, (C1-C10) alcoxialquilo, (C1-C10) haloalquilo, (C1-C10) alquilo, aril alcoxi y aril éster.

25 En otro aspecto preferente de la presente invención, se proporcionan compuestos seleccionados del grupo que comprende:

JB-399: 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-4"-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol

IIS-358: 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-2',4"-dimetoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol

30 IIS-311: 2,2',2",2"'-(4''-(benciloxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-478: 2,2',2",2"'-(3',4-dimetoxi-4''-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-530: 2,2',2'',2'''-(4''-(ciclohexilmetoxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-420: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

IIS-375: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

5

IIS-792: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2'-etil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

IIS-758: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3'-etil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-806: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-

10 ol

e

IIS-711: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina.

15 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) útil para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano.

En aún otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I); y
20 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable, útil para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para reconocer
25 específicamente el bucle interno IIB del ARN RRE del virus VIH-1.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para inhibir la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ del VIH-1.

30

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para bloquear la replicación del VIH-1 *in vivo*.

En aún otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para prevenir y/o tratar infecciones por VIH-1 y enfermedades relacionadas, tales como: infecciones causadas por otros virus ARN como el virus del síndrome respiratorio agudo severo, el virus de la gripe y el virus Ébola entre otros; enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser utilizados para modular la función de bucles internos de ARN tales como los contenidos en la telomerasa o en el sitio interno de entrada al ribosoma de oncogenes humanos como I-myc (relevantes para el tratamiento de diversos tipos de cáncer incluyendo neuroblastoma entre otros), en las subunidades ribosómicas y biointerruptores bacterianos (relevantes para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* entre otras), o en regiones funcionales de moléculas de ARN viral como el dominio 3'X del virus de la hepatitis C (relevantes para el tratamiento de infecciones causadas por éste y otros virus ARN); y enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser utilizados como agonistas o inhibidores de proteínas con dominios α -hélice en interacción con otras biomoléculas, como el factor de transcripción c-myc en interacción con ADN y proteínas como Max (relevante para el tratamiento de diversos tipos de cáncer tales como el linfoma de Burkitt y los cánceres de colon y próstata entre otros), o las proteínas Rev y Gag en interacción con la señal de empaquetamiento del virus VIH-1, o la proteína Rev en interacción con otros monómeros de Rev.

Adicionalmente también es un objeto de la presente invención el uso de un compuesto de Fórmula I para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y/o otras enfermedades causadas por otros virus ARN, enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la modulación de la función de bucles internos de ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la inhibición o mimetismo de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

Es también un objeto de la presente invención un método de tratamiento en humanos de infecciones por VIH-1 y enfermedades relacionadas, tales como: infecciones causadas por otros virus ARN como el virus del síndrome respiratorio agudo severo, el virus de la gripe y el virus Ébola entre otros; enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos

puedan ser utilizados para modular la función de bucles internos de ARN tales como los contenidos en la telomerasa o en el sitio interno de entrada al ribosoma de oncogenes humanos como I-myc (relevantes para el tratamiento de diversos tipos de cáncer incluyendo neuroblastoma entre otros), en las subunidades ribosómicas y biointerruptores bacterianos (relevantes para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias como *Staphilococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* entre otras), o en regiones funcionales de moléculas de ARN viral como el dominio 3'X del virus de la hepatitis C (relevantes para el tratamiento de infecciones causadas por éste y otros virus ARN); y enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser utilizados como agonistas o inhibidores de proteínas con dominios α -hélice en interacción con otras biomoléculas, como el factor de transcripción c-myc en interacción con ADN y proteínas como Max (relevante para el tratamiento de diversos tipos de cáncer tales como el linfoma de Burkitt y los cánceres de colon y próstata entre otros), o las proteínas Rev y Gag en interacción con la señal de empaquetamiento del virus VIH-1, o la proteína Rev en interacción con otros monómeros de Rev

15

Y finalmente es también otro objeto de la presente invención, un procedimiento para la obtención de los compuestos de Fórmula general (I), que comprende la formación de sucesivos enlaces C-C por acoplamiento de Suzuki entre halogenuros, ariltriflatos y ésteres borónicos de los anillos de 6 miembros A, B y C conteniendo grupos bilaterales, catalizados por paladio. En este procedimiento, los derivados halogenuro de A y C introducen R^1 , R^2 , R^5 , y R^6 en la molécula final de acuerdo con la Fórmula (I), y el éster borónico de B introduce R^3 y R^4 en la molécula final de acuerdo con la Fórmula (I).

Se pretende que la presente invención abarque todas las formas ionizadas farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales) y solvatos (por ejemplo, hidratos) de los compuestos de Fórmula (I) independientemente de si se especifican tales formas y solvatos, ya que se conoce bien en la técnica que pueden usarse agentes farmacéuticos en una forma ionizada o solvatada.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden contener uno o más centros quirales y existir en formas ópticamente activas. Cuando un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo contiene un único centro quiral, puede existir en dos formas enantioméricas. La presente invención incluye enantiómeros individuales y mezclas de estos enantiómeros, que pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Cuando un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo contiene más de un centro quiral, puede existir en formas diastereoméricas. La presente invención incluye cada diastereómero y mezclas de estos diastereómeros, que pueden obtenerse mediante métodos conocidos
5 por los expertos en la técnica.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden formar sales orgánicas e inorgánicas, por ejemplo, con ácidos inorgánicos u orgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido maleico, acético ácido, ácido
10 succínico, ácido benzoico, ácido palmítico, ácido dodecanoico y aminoácidos ácidos, tales como ácido glutámico, hidróxidos de metales alcalinos, por ejemplo, hidróxido de sodio; con aminoácidos, por ejemplo, lisina o arginina. Las sales formadas con compuestos de Fórmula (I) pueden usarse en la presente invención siempre que sean farmacéuticamente aceptables. Tales sales y solvatos correspondientes también se encuentran dentro del
15 alcance de la presente invención.

Profármacos de los compuestos de Fórmula (I) también son el objeto de la presente invención. Tal como se conoce en la técnica, los profármacos se alteran *in vivo* y se transforman en un compuesto de la presente invención. Se pretende que todos los métodos
20 convencionales de uso de los compuestos de la presente invención, tanto si se especifica la administración del profármaco como si no, comprendan la administración de un profármaco que se convierte *in vivo* en un compuesto según la presente invención.

Es posible una variedad de vías de administración de los compuestos y las composiciones
25 de la presente invención incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), oral (por ejemplo, en la dieta o por inhalación), tópica, nasal, rectal, o mediante microportadores de liberación lenta, dependiendo del estado que va a tratarse. La administración oral, parenteral e intravenosa son modos de administración preferidos. La formulación de los compuestos de
30 la presente invención que va a administrarse variará según la vía de administración seleccionada (por ejemplo, disolución, emulsión, gel, aerosol, cápsula). Formas farmacéuticas adicionales según la presente invención son, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, pomadas, cremas, pastas, geles, tinturas, barras de labios, gotas, jarabes, aerosoles y pulverizaciones.

Una composición apropiada de la presente invención que comprende el compuesto o los compuestos de Fórmula (I) puede prepararse en un vehículo o portador fisiológicamente aceptable y adyuvantes y conservantes opcionales. Para disoluciones o emulsiones, los portadores adecuados incluyen, por ejemplo, suspensiones, emulsiones o disoluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados, agua estéril, cremas, pomadas, lociones, aceites, pastas y portadores sólidos. Los vehículos parenterales pueden incluir disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, disolución de Ringer con lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o reconstituyentes de fluidos, nutrientes o electrolitos. (Véase Remington's Pharmaceutical Science, 16^a edición, Mack, Ed. (1980)).

Las composiciones preferidas para su administración parenteral están en forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, dispersiones y composiciones liofilizadas de los compuestos de la invención, preferiblemente en forma de suspensiones, emulsiones, dispersiones o disoluciones acuosas isotónicas. Estas composiciones son preferiblemente estériles, o bien procesándose en un entorno estéril durante todo su proceso de preparación o bien esterilizándose al final de dicho proceso. Además, su fabricación se lleva a cabo habitualmente en condiciones estériles, al igual que el llenado, por ejemplo, en ampollas o viales y el sellado de los envases. Estas composiciones pueden estar listas para su aplicación o pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo como un liofilizado) que requiere reconstitución antes de su aplicación.

Las composiciones parenterales según la presente invención pueden comprender excipientes, por ejemplo vehículos, estabilizadores (agentes reductores, anti-oxidantes y/o agentes secuestrantes), agentes de tamponamiento, conservantes, agentes isotonizantes, emulsionantes, solubilizantes, agentes aumentadores de la viscosidad y/o agentes de carga y se preparan mediante procedimientos convencionales bien conocidos por los expertos de la técnica.

Una vía preferida de administración es la oral. Las composiciones orales farmacéuticas en forma oral sólida (comprimidos, cápsulas blandas, cápsulas duras o cualquier otra) según la presente invención comprenden excipientes, siempre que sean compatibles con el principio activo de la composición, incluyendo, pero sin limitarse a, diluyentes, aglutinantes,

disgregantes, surfactantes, deslizantes, lubricantes, antioxidantes o secuestrantes de radicales libres, componentes de recubrimiento, opacificantes o plastificantes.

5 Si se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el compuesto de la presente invención puede mezclarse con un vehículo farmacéutico, ejemplos del cual incluyen sílice, almidón, lactosa, estearato de magnesio y talco. Los comprimidos pueden recubrirse con sacarosa u otra sustancia apropiada o pueden tratarse de modo que tengan una actividad sostenida o retrasada y de modo que liberen una cantidad predeterminada de principio activo de manera continua. Pueden obtenerse cápsulas de gelatina mezclando el
10 principio activo con un diluyente e incorporando la mezcla resultante en cápsulas de gelatina blanda o dura. Un jarabe o elixir puede contener el principio activo junto con un edulcorante, un antiséptico (por ejemplo metilparabeno y/o propilparabeno), un aromatizante y un colorante apropiado. Los gránulos o polvos dispersables en agua pueden contener el principio activo mezclado con dispersantes o agentes humectantes o con agentes de
15 suspensión tales como polivinilpirrolidona, así como con edulcorantes o correctores del sabor.

El término “portador farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en la presente invención incluye cualquier disolvente, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y
20 retardantes de la absorción, y similares que sean compatibles con la actividad de los compuestos y sean fisiológicamente aceptables para el sujeto.

La “cantidad eficaz” tal como se usa en la presente invención incluye la cantidad del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster, isómero, solvato o
25 profármaco del mismo que permite que realice su función prevista, es decir, tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones por VIH-1 así como otras enfermedades, tales como infecciones causadas por otros virus ARN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan ser utilizados para modular la función de bucles de ARN, o como agonistas o inhibidores de proteínas con dominios α -hélice en interacción con otras
30 biomoléculas.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la sustancia activa de la presente invención mediante una vía apropiada en una sola dosis o múltiples dosis. La cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de varios factores, incluyendo actividad

biológica, modo de administración, frecuencia de tratamiento, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, edad, peso corporal, sexo, salud general, gravedad del estado que va a tratarse, así como propiedades farmacocinéticas apropiadas. Un experto en la técnica puede determinar la dosificación apropiada basándose en los factores anteriores.

5

Los compuestos de la invención pueden administrarse inicialmente con una dosificación adecuada que puede ajustarse según se requiera, dependiendo de la respuesta clínica. En general pueden obtenerse resultados satisfactorios cuando los compuestos de la invención se administran a un ser humano a una dosificación diaria de entre aproximadamente 0.05
10 mg y 100 mg por Kg de peso corporal (medida como la forma sólida). Una dosis preferida aproximada oscila entre 0.1 – 50 mg/Kg/día, más preferiblemente entre aproximadamente 1 – 20 mg/Kg/día.

El compuesto puede administrarse en forma de composiciones farmacéuticas que
15 comprenden el compuesto una vez al día o en diferentes momentos en el día, de manera profiláctica o terapéutica, preferiblemente en una cantidad eficaz contra la infección por VIH-1 o la enfermedad relacionada, a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que requiere tal tratamiento. En el caso de un individuo que tiene un peso corporal de aproximadamente 75 kg, la dosis diaria de la mezcla administrada es desde aproximadamente 0.004 g hasta
20 aproximadamente 7.5 g, preferiblemente desde aproximadamente 0.075 g hasta aproximadamente 0.150 g, de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster, isómero, solvato o profármaco del mismo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden desde
25 aproximadamente el 0.05% hasta aproximadamente el 80% (en peso) de una mezcla de un compuesto de Fórmula (I).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse, si se desea, de modo que proporcionen una liberación inmediata o modificada del principio activo
30 después de su administración a un paciente.

Las formas de administración de dosis unitaria según la presente invención comprenden desde aproximadamente el 0.05% hasta aproximadamente el 80% del compuesto de Fórmula (I).

Las formas de dosis unitaria según la presente invención se refieren, por ejemplo, a comprimidos recubiertos y sin recubrir, microcápsulas, cápsulas duras y blandas, grageas, dosis en polvo, ampollas, viales y supositorios.

5

La presente invención se refiere especialmente al uso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, isómero, solvato y/o profármaco, como tal o en forma de una formulación farmacéutica con al menos un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento terapéutico y también profiláctico de infecciones por VIH-1 y enfermedades relacionadas.

10

Obtención de los compuestos de la invención

15

1.- Diseño computacional de inhibidores RRE-Rev.

Tomando como base la estructura tridimensional de Rev₃₄₋₅₀ unido al bucle interno IIB del RRE⁶ (Fig. 1, a), los inventores se propusieron diseñar ligandos orgánicos que mimetizaran la distribución tridimensional de las cadenas laterales de la α -hélice Rev₃₄₋₅₀ en su complejo con el ARN. A este respecto, otros autores habían indicado que moléculas p-terfenílicas tris-*orto*-sustituidas podían mimetizar una cara de un péptido en conformación α -hélice mediante la adopción de una conformación escalonada que reproducía el ángulo de orientación de tres cadenas laterales aminoacídicas, y que algunos de estas moléculas eran capaces de inhibir interacciones proteína-proteína¹³. Para el propósito de esta invención, los inventores pensaron que la introducción de sustituyentes a *ambos* lados de un esqueleto *para*-terfenílico permitiría una proyección de cadenas laterales en un abanico de 360° similar a la observada en el complejo IIB-Rev₃₄₋₅₀, donde dos tercios de la α -hélice están rodeados por ARN. Un análisis conformacional *in silico* de una molécula p-terfenílica hexakis-*orto*-sustituida con grupos bilaterales modelo confirmó esta predicción: mientras que la orientación *orto* de los sustituyentes indujo una conformación escalonada, la presencia de sustituyentes a ambos lados de los anillos aseguró una amplia proyección de cadenas laterales en el espacio (Fig. 1, b). Cálculos de “*docking*” posteriores apoyaron la hipótesis de que estas moléculas podrían unirse al bucle RRE mimetizando la α -hélice Rev₃₄₋₅₀. En estos

20

25

30

cálculos se encajaron diversas moléculas p-terfenílicas hexakis-sustituidas, así como distintos isómeros posicionales de moléculas tetrakis p-bifenílicas y tris p-terfenílicas, en la estructura RRE⁶ (códigos PDB 1ETF and 1ETG). Los mejores resultados se obtuvieron para los ligandos p-terfenílicos hexakis-*orto*-sustituidos con grupos bilaterales (definidos por la

5 Formula I), cuyas conformaciones de unión reprodujeron de manera aproximada la orientación de Rev₃₄₋₅₀ en su complejo con RRE. Después de evaluar distintas posibilidades para los sustituyentes de los anillos de benceno mediante cálculos adicionales, los inventores concluyeron que cadenas laterales compuestas por grupos 2-amino-etilo serían sintéticamente accesibles y podrían dar lugar a interacciones apropiadas con el esqueleto

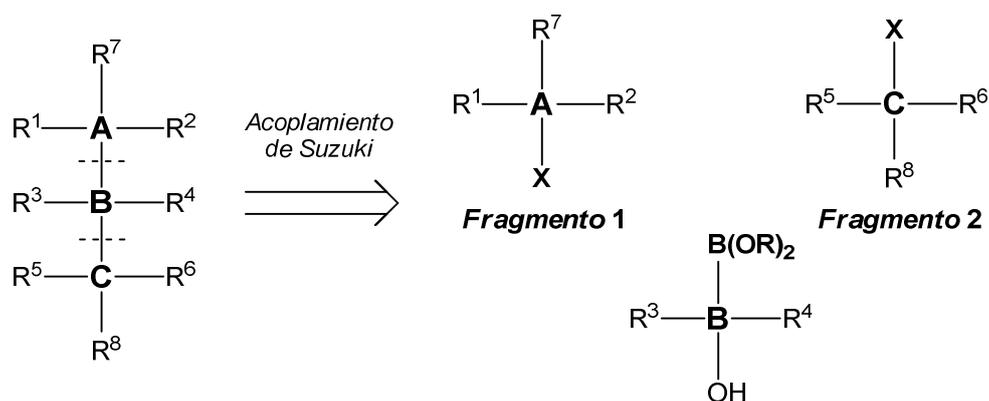
10 azúcar-fosfato del bucle interno del RRE.

2.- Síntesis de p-bifenilos y p-terfenilos con sustituciones bilaterales.

Tomando como base las predicciones computacionales, los inventores sintetizaron

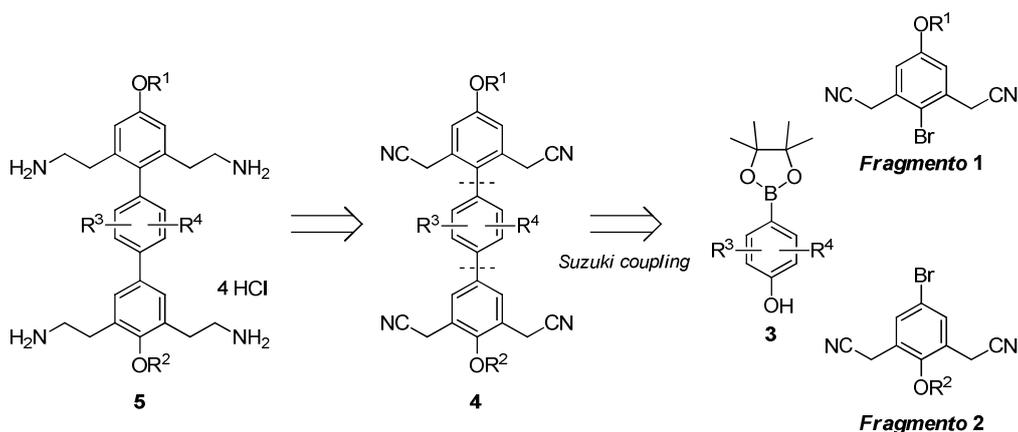
15 moléculas p-bifenílicas y p-terfenílicas con sustituciones bilaterales en los anillos de benceno, descritas por la Fórmula (I). Las síntesis se basaron en una sucesión de acoplamientos de Suzuki, catalizados por paladio¹⁴⁻¹⁶, entre aril halógenos y esteres aril borónicos, como se muestra en el siguiente esquema:

20



Esquema 1a

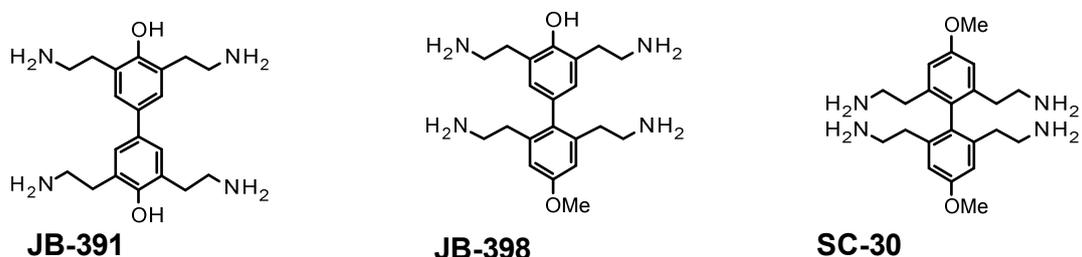
25 Para el caso de los compuestos preferidos de la presente invención el esquema sintético es el siguiente:



A pesar de la aparente simplicidad de la ruta sintética, según los datos obtenidos este tipo de estructuras terfenílicas polisustituidas no había sido descrito hasta el momento.

En una primera fase se sintetizó el siguiente grupo de tetrakis (2-aminoetil) 1-1' bifenilos, con cadenas laterales 2-aminoéticas ocupando las posiciones bilaterales 3,5 y 2',6' (JB-398), 2,6 y 2',6' (SC-30), y 3,5 y 3',5' (JB-391):

10



JB-391: 3,3',5,5'-tetrakis(2-aminoetil)-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diol

JB-398: 2',3,5,6'-tetrakis(2-aminoetil)-4'-metoxi-[1,1'-biphenyl]-4-ol

SC-30: 2,2',2'',2'''-(4,4'-dimetoxi-[1,1'-biphenyl]-2,2',6,6'-tetraol)tetraetilamina

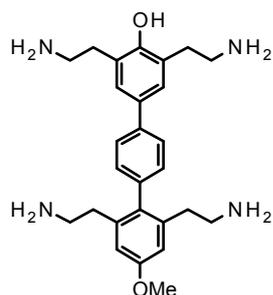
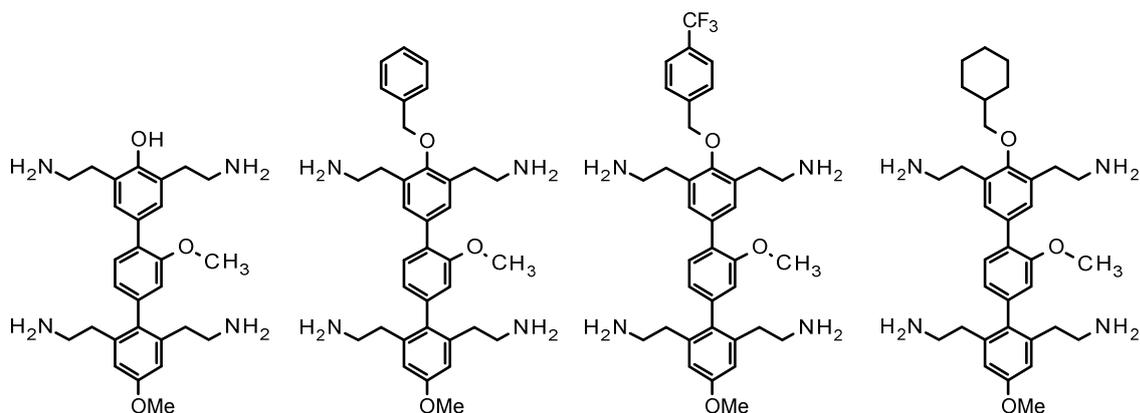
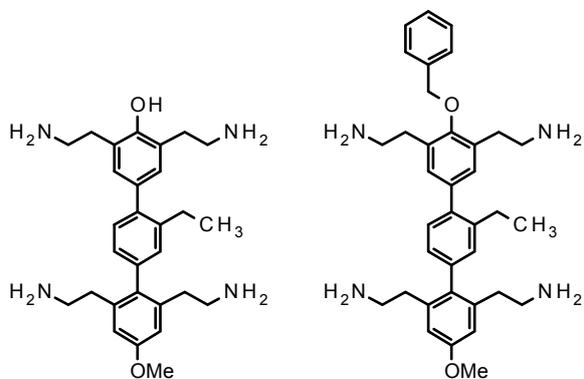
15

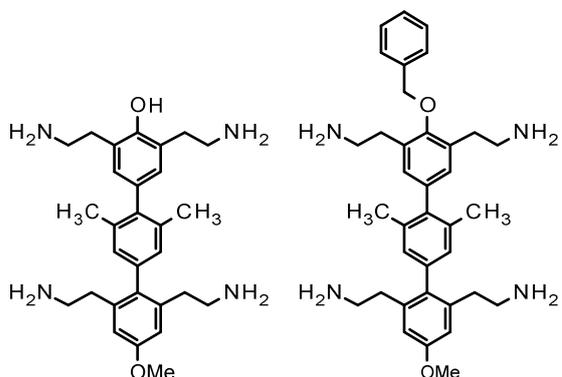
Por impedimento estérico, las cadenas bilaterales 2-aminoéticas en posiciones 2' y 6' (*orto*) de JB-398 inducen la adopción por este bifenilo de una conformación escalonada, similar a la adoptada por los p-terfenilos 3,2',2''-tris-sustituídos que se comportan como miméticos de α -hélice¹³. Este impedimento estérico está maximizado en SC-30, donde las cuatro cadenas

2-aminoéticas ocupan posiciones *orto* respecto a los carbonos que enlazan los dos anillos

de benceno. Por el contrario, las cadenas bilaterales 2-aminoetilicas de JB-391 son *meta*, permitiendo a esta molécula adoptar una conformación plana.

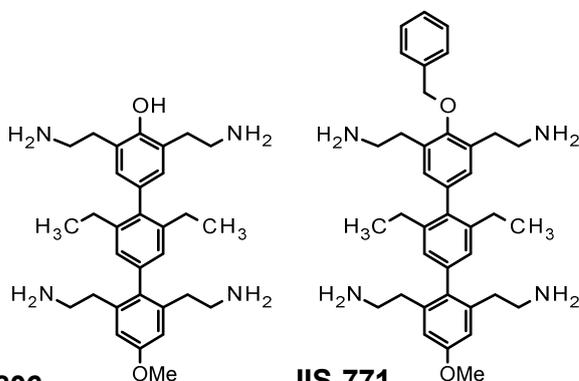
A continuación se sintetizaron las siguientes moléculas terfenílicas siguiendo el método descrito anteriormente:

**JB-399****IIS-358****IIS-311****IIS-478****IIS-530****IIS-792****IIS-758**



IIS-420

IIS-375



IIS-806

IIS-771

- 5 JB-399: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
- IIS-358: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',4''-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
- IIS-311: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina
- 10 IIS-478: 2,2',2'',2'''-(3',4-dimetoxi-4''-(4-(trifluorometil)benciloxi)-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina
- IIS-530: 2,2',2'',2'''-(4''-(ciclohexilmetoxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina
- IIS-420: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6''-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
- IIS-375: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5''-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina
- 15 IIS-792: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2'-etil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

IIS-758: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3'-etil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

IIS-806: 2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol

5 IIS-711: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetil)tetraetilamina

El primero de los terfenilos sintetizados (JB-399) contiene cuatro cadenas 2-aminoéticas que ocupan las posiciones bilaterales 3,5 y 2'',6'' de los dos bencenos terminales, pero no posee sustituyentes en el anillo central. En este caso, se espera una conformación escalonada para el enlace 4'-1'' que une el segundo y tercer anillo de benceno, pero no para el otro. Los 3,5,2'',6'' tetrakis (2-aminoetilo) terfenilos de la segunda serie contienen un solo grupo metoxi (IIS-358, IIS-311, IIS-478 e IIS-530) o etilo (IIS-792 e IIS-771) en la posición 2' del anillo central. Por impedimento estérico, estos terfenilos adoptarán una conformación escalonada en torno a los dos enlaces benceno-benceno. Los compuestos de esta serie contienen distintos grupos unidos al carbono 4 (*para*) del primer anillo: hidroxilo (IIS-358 e IIS-792), benciloxi (IIS-311 e IIS-758), p-trifluorometil-benciloxi (IIS-478) y ciclohexilmetoxi (IIS-530). La tercera serie de 3,5,2'',6'' tetrakis (2-aminoetilo) terfenilos contiene dos grupos metilo (IIS-420 e IIS-375) o etilo (IIS-806 e IIS-771) en las posiciones bilaterales 2' y 6' del anillo central, así como sustituyentes 4-hidroxilo (IIS-420 e IIS-806) y 4-benciloxi (IIS-375 y IIS-771) en el primer anillo. Estas moléculas son 3,5,2',2'',6'',6'' hexakis p-terfenilos conteniendo grupos bilaterales en los tres anillos de benceno. Según los cálculos basados en estructura, estas moléculas serían los mejores miméticos de Rev₃₄₋₅₀.

25 Funcionalidad de los compuestos de la invención

1.-Compuestos p-terfenílicos bilateralmente sustituidos se unen específicamente a la horquilla RRE con baja estequiometría.

30 La interacción entre los compuestos bifenílicos y terfenílicos sintetizados y el ARN RRE (SEQ. ID. No 1) se analizó mediante experimentos de resonancia superficial de plasmón (SPR)¹⁷. Además de RRE, se inmovilizaron otras dos horquillas de ARN control en los *chips* SPR: RRE_c (SEQ. ID. No 2) y TAR_c (SEQ. ID. No 3). La horquilla RRE_c contiene una

oposición G:G en lugar del bucle interno GGCG:ACGGUA que forma el sitio de alta afinidad de Rev, mientras que en la horquilla TAR_c el bucle interno de RRE se sustituye por el pequeño bucle interno UCU, reconocido por la proteína Tat del virus VIH-1¹⁸. De esta forma, los inventores de la presente invención han podido estudiar simultáneamente la interacción con RRE, RRE_c y TAR_c, obteniendo datos acerca de la especificidad de unión de los compuestos. Además, la metodología SPR permite la deducción de la estequiometría de las interacciones, que también están relacionadas con la especificidad de la interacción entre un ligando y una determinada molécula de ARN. Estas consideraciones son importantes en el campo del reconocimiento de ácidos nucleicos^{4,19}.

10

Los candidatos pusieron a punto la metodología SPR analizando la interacción de RRE con un péptido TRQARRNRRRRWRERQRAAAAR, identificado en lo sucesivo como revp (SEQ ID. No. 4), así como con el antibiótico neomicina B. revp contiene el tracto Rev₃₄₋₅₀ rico en argininas (TRQARRNRRRRWRERQR) que forma la α -hélice crítica para la interacción con RRE²⁰. Para la interacción RRE-revp, las curvas de unión se ajustaron con un modelo de un sitio de unión e indicaron una constante de disociación K_d de 4.2 ± 3.4 nM y una estequiometría 1:1. Este resultado indica que una sola molécula de revp interacciona con el sitio de alta afinidad de la horquilla RRE, formado por el bucle interno IIB⁶ (Fig. 1, a). La especificidad de la interacción RRE:revp se cuantificó calculando las relaciones $K_d(\text{RRE}_c)/K_d(\text{RRE})$ y $K_d(\text{TAR}_c)/K_d(\text{RRE})$, que resultaron ser 14.5 y 4.4, respectivamente. La K_d obtenida para revp mediante SPR concuerda muy bien con los valores de K_d publicados en la literatura para la interacción entre secuencias de RRE y péptidos similares^{21,22}. En el caso de neomicina B, las curvas de unión se ajustaron con un modelo de dos sitios, y se obtuvo una constante de disociación de 2.2 ± 1.4 μ M para la interacción entre dos moléculas de antibiótico y el sitio de mayor afinidad. Estos resultados también coincidieron con las K_d y estequiometrías de unión publicadas en la literatura para la interacción entre este antibiótico y RRE²². Con relaciones $K_d(\text{RRE}_c)/K_d(\text{RRE})$ y $K_d(\text{TAR}_c)/K_d(\text{RRE})$ de 0.9 y 2.3, respectivamente, la especificidad de la interacción RRE:neomicina resultó ser limitada, como se indicó en trabajos anteriores²³.

25
30

Tabla 1. Parámetros de interacción RRE-bifenilo y RRE-terfenilo determinados mediante experimentos SPR a 25°C: constantes de disociación en el equilibrio (K_d), estequiometrías de unión (n), y especificidad de la interacción, cuantificada mediante los cocientes $K_d(\text{RRE}_c)/K_d(\text{RRE})$ y $K_d(\text{TAR}_c)/K_d(\text{RRE})$ en relación a las horquillas control RRE_c y TAR_c.

compuesto ^a	K_d (RRE) (M·10 ⁶)	n^s (RRE)	$\frac{K_d(RRE_c)}{K_d(RRE)}$	$\frac{K_d(TAR_c)}{K_d(RRE)}$
JB-398	31.1 ± 5.0	4.3 ¹ ± 0.3	-	3.7
SC-30	>100	-	-	-
JB-399 ^b	14.4 ± 6.8	0.7 ¹ ± 0.1	-	11.7
IIS-358	13.0 ± 9.0	1.1 ² ± 1.0	1.9	6.0
IIS-311	9.4 ± 5.7	1.3 ² ± 0.6	4.9	3.2
IIS-478 ^c	14.0 ± 5.1	1.4 ² ± 0.4	10.3	9.6
IIS-530 ^b	46.2 ± 32.0	2.5 ¹ ± 1.1	1.3	4.0
IIS-792 ^c	8.1 ± 1.8	1.3 ¹ ± 0.1	1.2	1.6
IIS-758 ^c	16.7 ± 1.6	4.6 ¹ ± 0.2	1.3	2.0
IIS-806 ^c	8.1 ± 1.1	2.1 ¹ ± 0.1	1.1	1.3
IIS-771 ^c	17.6 ± 1.8	2.7 ¹ ± 0.1	1.0	1.7

^aLas curvas de interacción se ajustaron mediante funciones modelo de uno o dos sitios de unión (indicado con superíndices s=1 o s=2). Cuando s=2, los valores K_d y n corresponden al sitio de mayor afinidad. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6.25 excepto donde se indica.

^bValores determinados usando un rango de concentraciones de ligando de 0.1-25 μ M.

^cValores determinados a pH 7.4. A pH 6.25 se obtuvieron valores muy similares de K_d , n^s y $K_d(RRE_c)/K_d(RRE)$: 12.1 ± 3.1 μ M, 2.1² ± 0.4 moléculas y 10.2, respectivamente.

^dValores determinados a pH 7.4, usando un rango de concentraciones de ligando de 0.1-25 μ M.

Quando los ligandos bifenílicos y terfenílicos se evaluaron mediante estos experimentos, los mejores resultados se obtuvieron para las moléculas tetrakis (2-aminoetilo) terfenílicas, algunas de las cuales fueron capaces de unirse a la horquilla RRE con afinidades de $8 \mu\text{M}$ y estequiometrías de unión que oscilaron entre una y dos moléculas para el sitio de mayor
5 afinidad (Fig. 2 y Tabla 1). Los terfenilos conteniendo un grupo relativamente polar (metoxi) en el anillo de benceno central, particularmente IIS-358, IIS-311 e IIS-478, dieron lugar a los mejores datos de especificidad, con relaciones $K_d(\text{RRE}_c)/K_d(\text{RRE})$ y $K_d(\text{TAR}_c)/K_d(\text{RRE})$ de hasta 10.3 y 9.6, respectivamente (Tabla 1 y Fig. 2), comparables a las obtenidas con el péptido revp (14.5 y 4.4). Los compuestos terfenílicos conteniendo grupos hidrofóbicos
10 (metilo y etilo) en el anillo central mostraron más afinidad por la horquilla RRE. Aunque la especificidad de estos compuestos respecto a RRE_c y TAR_c disminuyó, su interacción con RRE ocurrió con estequiometrías bajas (Tabla 1). Estos datos son indicativos de que los ligandos se unen a un sitio específico en la horquilla RRE.

15 2.-Experimentos de espectroscopia de RMN demuestran una interacción específica entre el bucle interno de RRE y ligandos terfenílicos con sustituciones bilaterales.

La interacción entre RRE y los compuestos bifenílicos y terfenílicos también se evaluó mediante experimentos mono- y bi-dimensionales de espectroscopia de resonancia
20 magnética nuclear (RMN) (Fig. 3). Esta técnica permitió no sólo examinar la fortaleza de las interacciones, sino también la localización del sitio de unión de los ligandos en el ARN, y detectó diferencias significativas a este respecto entre los distintos compuestos. Los bifenilos JB-391, JB-398 y SC-30 apenas produjeron cambios detectables en el espectro TOCSY de RRE, incluso a relaciones molares RRE:ligando elevadas (1:6) (Fig. 3, abajo), o
25 bien indujeron cambios que no afectaron de manera específica a los residuos del bucle interno. La unión del antibiótico de referencia neomicina B, evaluado mediante la misma metodología, también afectó de manera similar a residuos de los dos tallos que flanquean el bucle interno. Por el contrario, los compuestos de la serie 3,5,2",6" tetrakis (2-aminoetilo) terfenílica únicamente dieron lugar a cambios de desplazamiento químico en nucleótidos del
30 bucle interno o inmediatamente adyacentes, particularmente C20, U23 y C25 (Fig. 3). Estas variaciones resultaron ser más pronunciadas para los terfenilos conteniendo grupos hidrofóbicos (metilo y etilo) en el anillo de benceno central. Los terfenilos IIS-358 e IIS-311, conteniendo un grupo más polar (metoxi) en el anillo central, y en menor medida JB-399, dieron lugar a variaciones similares pero menos pronunciadas. De toda la serie 3,5,2",6"

tetrakis (2-aminoetilo) terfenilica, IIS-420 e IIS-806, conteniendo dos grupos metilo y etilo, respectivamente, en las posiciones bilaterales 2' y 6' del benceno central dieron lugar a los mayores cambios de desplazamiento químico, así como a los picos de complejo más estrechos (Fig. 3, arriba y en medio). El bucle RRE pudo ser valorado con dos equivalentes
5 molares de estos compuestos. En general, estos resultados son consistentes con las constantes de disociación y estequiometrías de unión determinadas mediante experimentos SPR (Tabla 1).

El hecho de que únicamente los nucleótidos del bucle o los inmediatamente adyacentes
10 resulten afectados por la interacción indica claramente que los ligandos terfenílicos se unen específicamente al bucle interno de RRE. Además, en los complejos de RRE con los mejores ligandos (IIS-420 e IIS-806) se observaron NOEs intermoleculares débiles entre hidrógenos de los ligandos y protones del ARN situados en el surco mayor (resultados no mostrados). Estos contactos demuestran que la interacción con el bucle RRE tiene lugar en
15 el surco mayor, como ocurre con Rev₃₄₋₅₀⁴ (Fig. 1, a), e indican que los ligandos p-terfenílicos hexaquis-sustituidos con grupos bilaterales ocupan el sitio de unión de la α -hélice Rev₃₄₋₅₀ en el ARN RRE (Fig. 4). El examen de los espectros NOESY también reveló que IIS-420 e IIS-806 pueden provocar un cambio conformacional en el RRE similar al inducido por la unión de Rev₃₄₋₅₀. Al igual que ocurre con esta α -hélice^{4,23}, la unión de IIS-420 o IIS-806 a RRE
20 induce la adopción, por parte de la guanina G22 del bucle, de una conformación *anti* en lugar de la conformación *syn* observada en el bucle aislado²³⁻²⁵.

3.-Ligandos bifenílicos y terfenílicos inhiben la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ *in vitro*.

25 Empleando un ensayo basado en anisotropía de fluorescencia, los inventores evaluaron la capacidad de los distintos ligandos bifenílicos y terfenílicos de inhibir la interacción entre RRE y Rev₃₄₋₅₀. Para este experimento se empleó un péptido GTRQARRNRRRRWRERQRAAAAR etiquetado con el fluoróforo FITC (identificado en lo sucesivo como frevp; SEQ ID. No. 5) y la horquilla de ARN RRE (SEQ. ID. No 1). Los
30 resultados se muestran en la Tabla 2 y Fig. 5.

Tabla 2. Inhibición de la interacción RRE-Rev₄₅₋₅₀. Concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) de moléculas bifenílicas y terfenílicas, obtenidas mediante un ensayo de polarización de fluorescencia.

5

10

15

20

25

30

compuesto	IC ₅₀ ^a (M·10 ⁶)
JB-391	5.6 ± 4.2
JB-398	22.1 ± 5.8
SC-30	308.7 ± 68.9
JB-399	23.4 ± 3.6
IIS-358	808.0 ± 461.7
IIS-311	162.2 ± 117.6
IIS-478	232.0 ± 32.7
IIS-530	75.5 ± 39.9
IIS-792	93.6 ± 24.4
IIS-758	78.1 ± 6.5
IIS-806	56.4 ± 13.5
IIS-771	77.2 ± 15.5
IIS-420	7.0 ± 0.6
IIS-375	32.2 ± 2.3

^aObtenidos con 60 nM RRE y 10 nM frevp. No se detectó desplazamiento RRE-frevp para los fragmentos 2,6-(2aminoetil)-4-metoxi-1-bromo-benceno y 2,6-(2aminoetil)-4-benciloxi-1-bromo-benceno, utilizados como control.

- 5 Este ensayo fue validado midiendo los valores IC_{50} y K_i del péptido revp y el antibiótico de referencia neomicina B. La constante de inhibición K_i obtenida para revp (7.0 ± 1.4 nM) concordó muy bien con la constante de disociación K_d determinada independientemente mediante SPR (4.2 ± 3.4 nM). El valor K_i obtenido para el antibiótico de referencia neomicina B (3.5 ± 0.4 μ M) también coincidió con la K_d calculada por SPR (2.2 ± 1.4 μ M) y con valores
- 10 K_i previamente publicados en la literatura²².

Quando los ligandos bifenílicos y terfenílicos se evaluaron mediante este ensayo, los resultados indicaron que algunos de ellos eran capaces de inhibir la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ con valores IC_{50} de hasta 7.0 μ M (Fig. 5 y Tabla 2) y valores K_i de hasta 3.8 μ M. De

15 manera similar a lo observado con los experimentos SPR y RMN para la interacción RRE-ligando, la composición de los sustituyentes del anillo de benceno central tuvo un impacto importante en la actividad inhibitoria de la serie tetrakis (2-aminoetilo) terfenílica. Los compuestos más potentes resultaron ser nuevamente aquellos conteniendo grupos hidrofóbicos en el anillo de benceno central. Los más activos fueron IIS-420 e IIS-375, con

20 dos grupos metilo en las posiciones bilaterales 2' y 6' de este anillo, que exhibieron concentraciones IC_{50} de 7.0 y 32.2 μ M, respectivamente (valores K_i de 3.8 y 17.4 μ M) (Fig. 5), seguidos por JB-399, IIS-806, IIS-771 e IIS-758 (con valores IC_{50} de 23.4, 56.4, 77.2 y 78.1 μ M, respectivamente). Las moléculas terfenílicas conteniendo un sustituyente más polar (metoxi) en el anillo central, exhibieron valores IC_{50} más altos. Los bifenilos JB-391 y

25 JB-398, con valores IC_{50} de 5.6 y 22.1 μ M, respectivamente, resultaron ser sorprendentemente activos en este ensayo. Sin embargo, estas moléculas interaccionan pobremente con el bucle RRE (e.g. Fig. 3, abajo), por lo que es probable que ambas inhiban la interacción RRE-frevp a través de un mecanismo diferente.

- 30 4. Los inhibidores de RRE-Rev₃₄₋₅₀ bloquean la replicación del VIH-1 *in vivo* y producen este efecto a nivel post-transcripcional.

Los terfenilos IIS-420, IIS-758, IIS-375, IIS-771, IIS-792, IIS-806 y, en menor medida, el bifenilo JB391 mostraron actividad antiviral sin citotoxicidad tras ser evaluados con un ensayo celular, como se muestra en la Tabla 3a y en la Figura 6.

- 5 **Tabla 3.** Resultados de los ensayos celulares de inhibición de la replicación del virus. (a) Actividad anti-VIH (EC_{50} , NL4.3-Ren) y viabilidad celular (CC_{50}). (b) Actividad anti-VIH en pasos posteriores a la integración del virus en la célula (EC_{50} , post-integración). Todos los valores están expresados en μM , y los intervalos de confianza y el valor R^2 del ajuste se muestran cuando es posible.

10

Tabla 3a

compuesto	EC_{50} μM (NL4.3- Ren)	CC_{50} μM (viabilidad celular)
Neomicina B	>100	>100
JB-391	>50<100	>100
JB-398	>100	>100
JB-399	>100	>100
IIS-358	>100	>100
IIS-311	>100	>100
IIS-478	>100	>100
IIS-530	>100	>100
IIS-792	46.3	>100
Int. conf. 95%	35.0-61.2	
R^2	0.7029	
IIS-758	15.5	>100
Int. conf. 95%	11.4-21.1	

R ²	0.7912	
IIS-806	64.1	>100
Int. conf. 95%	49.2-83.5	
R ²	0.7861	
IIS-771	42.6	>100
Int. conf. 95%	32.3-56.1	
R ²	0.8583	
IIS-420	3.4	>100
Int. conf. 95%	1.7-6.9	
R ²	0.9712	
IIS-375	40.6	>100
Int. conf. 95%	28.9-57.2	
R ²	0.9885	

Tabla 3b

Compuesto	IIS-420	IIS-375	IIS-758
EC₅₀ μM (post-integración)	5.0	21.4	17.0
Int. conf. 95%	0.7-34.0	15.3-29.9	3.6-80.7
R ²	0.8648	0.9931	0.8629

5

IIS-420 resultó ser el inhibidor más potente, con un valor de EC₅₀ de 3.4 μM (Tabla 3a). Esta molécula es un 3,5,2',2'',6',6'' hexakis p-terfenilo con sustituciones bilaterales en los tres anillos incluyendo dos grupos metilo en el benceno central, y exhibió el valor IC₅₀ más bajo de la serie terfenilica en los experimentos de inhibición de la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ (Tabla 2). IIS-758 (EC₅₀ 15.52 μM) también mostró una actividad anti-VIH significativa, seguido por IIS-375, IIS-771, IIS-792 e IIS-806, con valores EC₅₀ de 40.6, 42.6, 46.3 y 64.1 μM, respectivamente. En consonancia con los resultados de los ensayos *in vitro* de unión a RRE

10

e inhibición RRE-Rev₃₄₋₅₀, los compuestos más activos *in vivo* contienen grupos hidrofóbicos (metilo o etilo) en el anillo de benceno central. El bifenilo JB-391 también exhibió actividad en el ensayo NL4.3-Ren, pero no la suficiente para calcular con fiabilidad su valor EC₅₀ (>50<100 μM). El control de neomicina B no inhibió la replicación del VIH-1 a las
5 concentraciones evaluadas. Ninguno de los compuestos mostró toxicidad a concentraciones por debajo de la concentración máxima evaluada, 100 μM (Tabla 3a).

Con objeto de evaluar la actividad de los compuestos más activos en las etapas transcripcionales y post-transcripcionales del ciclo de vida del virus, también se utilizaron
10 plásmidos luciferasa bajo el control del genoma completo del VIH-1. De esta manera, se evaluó específicamente la actividad anti-VIH de los inhibidores en estas etapas, que incluyen la transcripción y el transporte del ARN viral al citoplasma. IIS-420 fue nuevamente el compuesto más potente en este ensayo (Tabla 3b), con un valor EC₅₀ de 5.0 μM semejante al obtenido en los ensayos de infección (Tabla 3a), lo que sugiere que su diana
15 principal se encuentra en estas etapas. IIS-758 y IIS-375 también fueron capaces de inhibir los pasos posteriores a la integración del VIH-1. IIS-758 lo hizo con una potencia similar a la mostrada en el ensayo de infección, mientras que IIS-375 incluso exhibió un valor EC₅₀ menor (Tablas 3a y 3b). Otros compuestos, como IIS-771 o JB-391, no fueron activos en este ensayo (Fig. 6b).

20 Para descartar un mecanismo de acción inespecífico en el que la inhibición se debiera al bloqueo de la actividad luciferasa, utilizamos un ensayo basado en células HeLa Tet-On Luc. En este ensayo, la luciferasa se expresa de manera independiente del LTR del VIH-1 al ser activada con doxiciclina. IIS-420 e IIS-375 no inhibieron la actividad luciferasa a 100 μM,
25 descartando una posible actividad inespecífica.

Obtención de las composiciones farmacéuticas de la presente invención

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera
30 conocida en sí misma, por ejemplo por medio de procedimientos convencionales de mezclado, granulado, recubrimiento, disolución, emulsionado o liofilización. Opcionalmente, la fabricación de las composiciones según la presente invención incluye más etapas, tales como encapsulado liposómico.

En particular, un comprimido puede prepararse mediante compresión y moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse comprimiendo el compuesto activo de la presente invención en una máquina adecuada en una forma de flujo libre, por ejemplo, un polvo o gránulos, 5 opcionalmente mezclado con componentes, tales como aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes tensioactivos o de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto activo en polvo con cualquier portador adecuado.

10 En particular, puede prepararse un jarabe o suspensión añadiendo el compuesto activo de la presente invención a una disolución concentrada acuosa de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, a la que también puede añadirse cualquier componente auxiliar. Tales componentes auxiliares pueden incluir aromatizantes, un agente para retardar la cristalización del azúcar o un agente para aumentar la solubilidad de cualquier otro 15 componente, por ejemplo, tal como un alcohol polihidroxilado, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

Las formulaciones para administración rectal pueden prepararse con un portador convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca registrada comercial). 20 Pueden encontrarse detalles específicos relacionados con aspectos particulares de procedimientos convencionales de desarrollo galénico en "Encyclopedia of pharmaceutical technology" de Swarbrick y Boylan (1988-2001 NY, publicado por M. Dekker).

Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden prepararse en liposomas 25 o microesferas (o micropartículas), comprendiendo tales métodos esencialmente disolver los compuestos de la presente invención en una disolución acuosa, añadir los fosfolípidos y lípidos apropiados, junto con surfactantes si se requiere, y dializar y sonicar el material, según sea necesario. Se detallan técnicas de encapsulado liposómico en el libro de Claudio Nastruzzi "Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications" 30 (Boca Raton 2005, publicado por CRC Press) y en "Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications" de Lasic y Papahadjopoulos (1998 Amsterdam, NY, publicado por Elsevier).

EJEMPLOS

Se describe la invención adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de realización, que son realizaciones preferidas de la invención. Estos ejemplos son ilustrativos y no
5 limitativos. Debe entenderse por tanto que puede haber otras realizaciones que se encuentran dentro del espíritu y alcance de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

Ejemplo 1: Diseño basado en estructura de inhibidores RRE-Rev.

10

Modelado molecular. El análisis conformacional de una molécula terfenílica hexakis-sustituida con grupos bilaterales se llevó a cabo utilizando el campo de fuerzas Merck MMFF94²⁴ integrado en el paquete de programas MOE (CGC Inc.). Se hicieron variaciones sistemáticas de las torsiones benceno-benceno en intervalos de 30° y se minimizó la energía
15 potencial de los conformeros. Los cálculos de *docking* de moléculas bi- y terfenílicas con diferentes patrones de sustitución se realizaron utilizando la estructura de RRE 1ETF⁶ y el algoritmo Dock 5.0²⁵.

Para construir un modelo mejorado de un complejo RRE-terfenilo, se llevaron a cabo
20 cálculos de *docking* con los programas Autodock 3.05²⁶ y Gold 5.0²⁷ apoyados en los resultados de RMN. En base a los datos de RMN (Fig. 3), el sitio de unión del terfenilo IIS-311 se definió alrededor de la base C20 y en el surco mayor del bucle interno. Los cálculos permitieron una total flexibilidad del ligando, que fue previamente minimizado con el campo de fuerzas MMFF94s de MOE (CGC Inc.). A pesar de que tanto Autodock como Gold están
25 parametrizados para proteínas, ambos programas permiten emplear ARN como receptor y un trabajo previo había mostrado que Autodock 3.05 se comporta satisfactoriamente con este tipo de dianas²⁸. Los cálculos con Gold emplearon la función de ajuste GoldScore, optimizada para predecir conformaciones de unión de ligandos²⁷. Para los cálculos con Autodock, se asignaron cargas Amber 1994²⁹ y PEOE³⁰ a los átomos de ARN y terfenilo,
30 respectivamente, y la carga negativa de los grupos fosfato de ARN fue neutralizada²⁸. Con objeto de tener en cuenta la posible flexibilidad del ARN, se utilizaron como dianas varias estructuras de RRE depositadas en el PDB: aislado (estructuras 1CSL³¹ y 1DUQ³²) y unido al péptido Rev₃₄₋₅₀ (1ETF y 1ETG⁶) y a péptidos alternativos (1G70³³ y 1I9F³⁴). Los mejores resultados (Fig. 4) se obtuvieron con estructuras de RRE extraídas de complejos con Rev₃₄₋

50 (1ETF y 1ETG) y con estructuras de RRE aislado (1CSL y 1DUQ). Ambos algoritmos dieron lugar a energías de unión considerablemente peores con estructuras de RRE extraídas de complejos con péptidos diferentes a Rev₃₄₋₅₀ (1G70 y 1I9F). Estos resultados refuerzan la idea de que las moléculas p-terfenílicas bilateralmente sustituidas mimetizan la estructura de Rev₃₄₋₅₀ en su complejo con el bucle interno de RRE. Estos resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 2: Muestras de ARN y péptido.

10 El ARN RRE (SEQ ID No. 1) utilizado en los experimentos de espectroscopia de RMN y polarización de fluorescencia (FP) se adquirió de Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc.) y, tras eliminar los grupos protectores 2'-ACE, se purificó siguiendo un protocolo basado en electroforesis en gel y diálisis. Para los experimentos de SPR, RRE biotinilado en 5' y dos ARN control 5'-biotina-RRE_c (SEQ ID No. 2) y 5'-biotina-TAR_c (SEQ ID No. 3) se adquirieron de Microsynth AG ya purificados por HPLC, y se microdializaron en un tampón HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,40, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,005% (v/v) de surfactante P-20) antes de su inmovilización en *chips* de estreptavidina. En comparación con RRE, la horquilla RRE_c contiene una oposición G:G en lugar del bucle interno GGCG:ACGGUA que forma el sitio de alta afinidad de Rev, mientras que en la horquilla TAR_c el bucle interno de RRE es sustituido por el pequeño bucle interno UCU, reconocido por la proteína Tat del virus VIH-1¹⁸.

Para los experimentos de polarización de fluorescencia (FP), se empleó el péptido FITC-Ahx- GTRQARRNRRRRWRERQRAAAAR-amida (SEQ ID No. 5; denominado frevp), conteniendo el fluoróforo FITC unido a la glicina N-terminal (Genscript Inc.). Este péptido contiene el tracto Rev₃₄₋₅₀ rico en argininas (TRQARRNRRRRWRERQR) que forma la α -hélice esencial para la interacción con el bucle interno del RRE²⁰. Con el fin de poner a punto los experimentos de FP y SPR, se utilizó un péptido similar pero sin etiquetar, succinil-TRQARRNRRRRWRERQRAAAAR-amida (SEQ ID No. 4; identificado como revp), que también se adquirió de Genscript Inc. Ambos péptidos contienen aminoácidos AAAAR adicionales en su extremo C-terminal que favorecen la conformación α -hélice²¹. El antibiótico de referencia neomicina B fue suministrado por Sigma. Este antibiótico, los péptidos revp y frevp, y los compuestos bifenílicos y terfenílicos, fueron disueltos en agua y congelados hasta su utilización en los ensayos de RMN, SPR, FP y celulares.

Ejemplo 3: Experimentos de SPR indican que compuestos p-terfenílicos bilateralmente sustituidos son capaces de unirse a la horquilla RRE de manera específica y con baja estequiometría.

- 5 Los experimentos de *resonancia de plasmón superficial (SPR)* se llevaron a cabo a 25 °C en un equipo Biacore T100 (GE Healthcare), empleando *chips* de cuatro canales derivatizados con estreptavidina (tipo SA serie S), y una de las siguientes disoluciones acuosas como fase móvil: 10 mM MES (pH 6.25), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.005% P20, o bien 10 mM HEPES (pH 7.40), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% P20. Después de inmovilizar
- 10 aproximadamente 300 unidades de respuesta (RU) de las horquillas RRE, RRE_c y TAR_c en los *chips*, los compuestos fueron inyectados durante períodos de 10 minutos a concentraciones que oscilaron entre 0.01 o 0.1 μM y 100 o 200 μM, permitiendo a continuación un período de disociación de 10 minutos. La velocidad de flujo empleada en los experimentos fue 20 μL/min. Los canales de los *chips* fueron regenerados con disoluciones
- 15 acuosas compuestas por 0.5-1.0 M NaCl y 10-100 mM NaOH, dependiendo del ligando.

Las constantes de disociación en el equilibrio de los complejos ARN-ligando (K_d) fueron calculadas ajustando las curvas de unión a ecuaciones de uno o dos sitios:

$$RU = \frac{RU_{\max} \cdot C}{1 + K_d \cdot C} + RI$$

20

$$RU = \frac{RU_{\max 1} \cdot C}{1 + K_{d1} \cdot C} + \frac{RU_{\max 2} \cdot C}{1 + K_{d2} \cdot C} + RI$$

25

donde RU es la respuesta en la región de estado estacionario de los sensogramas, C es la concentración de compuesto libre en equilibrio con el complejo, RU_{\max} es la respuesta máxima, y RI es un parámetro de compensación característico del índice de refracción de la muestra. En estos modelos, K_d , RU_{\max} y RI son parámetros ajustables, y la estequiometría de cada sitio de unión se determinó comparando los valores de RU_{\max} extraídos del ajuste con los valores teóricos calculados a partir de los pesos moleculares de ARN y compuesto y de la cantidad de ARN inmovilizado en la celda de flujo³⁵. La ecuación de dos sitios de unión únicamente fue empleada en caso de mejorar significativamente el ajuste obtenido con el

30 modelo de un solo sitio. La especificidad de la interacción con RRE fue cuantificada

calculando los cocientes $K_d(\text{RRE}_c)/K_d(\text{RRE})$ y $K_d(\text{TAR}_c)/K_d(\text{RRE})$. Todos los experimentos de SPR fueron doblemente referenciados³⁶. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Figura 2.

5 Ejemplo 4: Experimentos de espectroscopía de RMN demuestran una interacción específica entre el bucle interno de RRE y ligandos terfenílicos bilateralmente sustituidos.

Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando espectrómetros Bruker Avance 500 MHz y Bruker Avance 600 MHz equipado con criosonda, y se analizaron mediante Topspin 1.3
10 (Bruker Biospin) y Sparky 3.110³⁷. Las muestras de RRE (habitualmente a una concentración de 60 μM) fueron previamente microdializadas en una disolución acuosa compuesta por 10 mM fosfato sódico (pH 6.0) y 0.1 mM EDTA. La interacción entre estas muestras de RRE y los compuestos bifenílicos y terfenílicos fue monitorizada a través de experimentos monodimensionales y bidimensionales (TOCSY) en D_2O . Partiendo de RRE
15 aislado, el ARN fue valorado progresivamente con ligando hasta obtener una proporción molar RRE:ligando entre 1:2 y 1:6, dependiendo de los cambios observados en los espectros. La interacción entre RRE y el antibiótico de referencia neomicina B fue monitorizada mediante un procedimiento similar. Los resultados se muestran en la Figura 3.

20 Los complejos de RRE con los mejores ligandos (IIS-420, IIS-375 e IIS-806) se estudiaron empleando mayor concentración de ARN (entre 0.12 y 0.18 mM) y proporciones molares RRE:terfenilo 1:1 y 1:2. Estos sistemas fueron examinados con más detalle mediante series de experimentos dqf-COSY, TOCSY y NOESY (con tiempos de mezcla entre 100 y 800 ms), así como con experimentos monodimensionales de transferencia de saturación. Todos estos
25 experimentos fueron obtenidos en D_2O a varias temperaturas (habitualmente 13, 25 y 38 $^\circ\text{C}$).

Una muestra de RRE aislado (0.39 mM), previamente microdializada en una disolución acuosa compuesta por 10 mM fosfato sódico (pH 6.0) 50 mM NaCl y 0.1 mM EDTA, también
30 se estudió mediante experimentos bidimensionales TOCSY, dqf-COSY y NOESY (normalmente con tiempos de mezcla de 80 y 250 ms) obtenidos a tres temperaturas diferentes (13, 27 y 38 $^\circ\text{C}$) en D_2O , así como experimentos TOCSY y NOESY (250 ms) a 17 $^\circ\text{C}$ en H_2O . Estos espectros fueron utilizados para identificar la mayor parte de los protones de RRE, utilizando como apoyo análisis previos de secuencias RRE³⁸.

Ejemplo 5: Experimentos de polarización de fluorescencia indican que los ligandos bifenílicos y terfenílicos inhiben la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ *in vitro*.

- 5 La capacidad de los ligandos bifenílicos y terfenílicos de inhibir la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ se evaluó mediante un ensayo de desplazamiento basado en anisotropía de fluorescencia. Para este experimento se empleó el péptido frevp etiquetado con el fluoróforo FITC (SEQ ID. No. 5) y la horquilla de ARN RRE (SEQ. ID. No 1). Los experimentos se realizaron a 25 °C utilizando un lector de placas Víctor X5 (Perkin Elmer Inc.) provisto de filtros de excitación y emisión de 480 y 535 nm, respectivamente, placas de 96 pocillos, y un tampón acuoso compuesto por 30 mM HEPES (pH 6.8), 100 mM KCl, 10 mM fosfato sódico, 10 mM acetato amónico, 10 mM cloruro de guanidinio, 2 mM MgCl₂, 20mM NaCl, 0.5 mM EDTA y 0.001% (v/v) Triton X-100³⁹.
- 10
- 15 RRE (a una concentración de 2 o 60 nM) y frevp (10 nM) fueron incubados en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor durante 5 minutos. Los datos de anisotropía se recopilaron a continuación cada 5 minutos durante un total de 15 minutos, para comprobar que se alcanzara un estado de equilibrio. Los valores de IC₅₀ fueron calculados ajustando la anisotropía observada (A_{obs}) a la siguiente ecuación mediante el programa GraphPad Prism
- 20 (GraphPad Software Inc.):

$$A_{obs} = A_f + \frac{(A_b - A_f)}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^m}$$

- donde A_f y A_b son los valores de anisotropía medidos para frevp aislado y unido a RRE, respectivamente, $[I]$ es la concentración total de inhibidor, IC_{50} es la concentración de
- 25 inhibidor necesaria para producir una inhibición del 50%, y m es la pendiente de la parte lineal de la curva sigmoidea.

Las constantes de inhibición (K_i) fueron calculadas a partir de los valores de IC_{50} utilizando la siguiente ecuación:

30

$$\log(IC_{50}) = \log(10^{\log(K_i)} \cdot (1 + \frac{[L]_t}{K_d}))$$

donde $[L]_t$ es la concentración total de frevp y K_d es la constante de disociación RRE-frevp. Estos valores únicamente se calcularon para inhibidores competitivos capaces de unirse específicamente al bucle interno de RRE con bajas estequiometrías, según los experimentos de SPR y/o RMN. Los resultados se muestran en la Figura 5 y en la Tabla 2.

5

Ejemplo 6: Plásmidos, virus y células.

El vector pNL4.3-Luc fue generado clonando el gen luciferasa en la región nef del clon proviral pNL4.3⁴⁰. El plásmido pNL4.3-Ren fue generado clonando el gen renilla en la región nef del clon proviral pNL4.3⁴¹.

10

Células MT-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD)⁴² fueron cultivadas en medio RPMI1640 completo suplementado con suero bovino fetal 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina (50 UI/mL) y estreptomina (50 µg/mL) (todos Whittaker M.A. Bio-Products). Las células HeLa Tet-On Luc fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina (50 IU/ml), Estreptomina (50 µg/ml) (todos Whittaker M.A. Bio-Products), higromicina (100 µg/ml) (Invitrogen) y geneticina (100 µg/ml) (Sigma). Las dos líneas celulares fueron cultivadas a 37°C con atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y pasadas dos veces a la semana.

15

20

Ejemplo 7: Ensayos celulares muestran que los inhibidores de RRE-Rev₃₄₋₅₀ bloquean la replicación del VIH-1 *in vivo* y producen este efecto a nivel post-transcripcional.

Evaluación de la actividad anti-VIH-1. Los sobrenadantes infecciosos fueron obtenidos mediante transfección de los plásmidos en células 293T mediante fosfato cálcico. Estos sobrenadantes fueron utilizados para infectar células MT-2 en placas de 96 pocillos de fondo en U en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. La cuantificación de la actividad antiviral se realizó 48 horas después de la infección. Para ello, las células fueron lisadas con 100 µL/pocillo del tampón apropiado (Luciferase Assay System Kit with Reporter Lysis Buffer o Renilla Lysis Buffer, Promega, Madison, WI). Las unidades relativas de luminiscencia (RLUs) se obtuvieron en un luminómetro (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) después de añadir el sustrato a los extractos celulares. La *viabilidad celular* fue evaluada en células tratadas de igual manera que en los ensayos de infección pero sin infectar. Después de 48 horas, la viabilidad se cuantificó

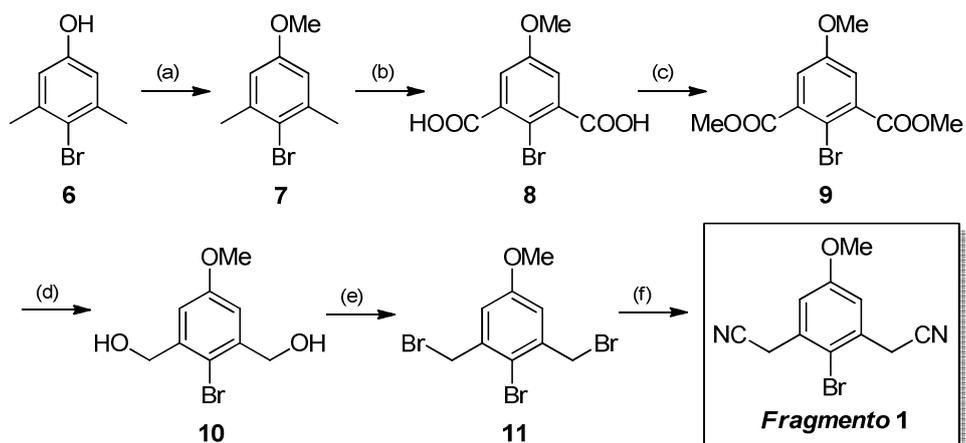
30

mediante el sistema CellTiter Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración inhibidora 50% (EC_{50}) y la concentración citotóxica 50 % (CC_{50}) se calcularon mediante el programa GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la Tabla 3a y Figura 6a. Para el ensayo *HeLa Tet-On Luc*, se sembraron células HeLa Tet-On Luc en placas de 24 pocillos el día antes del experimento y se mantuvieron en cultivo durante un día. A continuación el medio se cambió por medio fresco con diferentes concentraciones de los compuestos y las células se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. 6 horas después, los sobrenadantes se eliminaron, las células se lisaron con el tampón de lisis Luciferasa (Promega), y se midió la actividad luciferasa en un luminómetro. Los resultados se muestran en la Tabla 3a y Figura 6a.

Ensayos de Transfección. Células MT-2 se mantuvieron en cultivo sin estímulos y antes del ensayo se resuspendieron en 350 μL de RPMI sin suero y antibióticos y se transfectaron a 320 V, 1500 μF y resistencia máxima con los plásmidos a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/10^6$ células con un Easyject plus Electroporator (Equibio, Middlesex, UK). Después de la transfección, las células fueron inmediatamente cultivadas en RPMI completo suplementado con suero fetal bovino, glutamina y antibióticos, y tratadas o no con diferentes concentraciones de compuestos. Las células fueron recogidas 48 horas después y lisadas con el buffer de lisis Luciferasa (Promega). Las RLUs fueron cuantificadas en un luminómetro. Los resultados se muestran en la Tabla 3b y Figura 6b.

Ejemplo 8: Síntesis de compuestos bifenílicos y terfenílicos bilateralmente sustituidos.

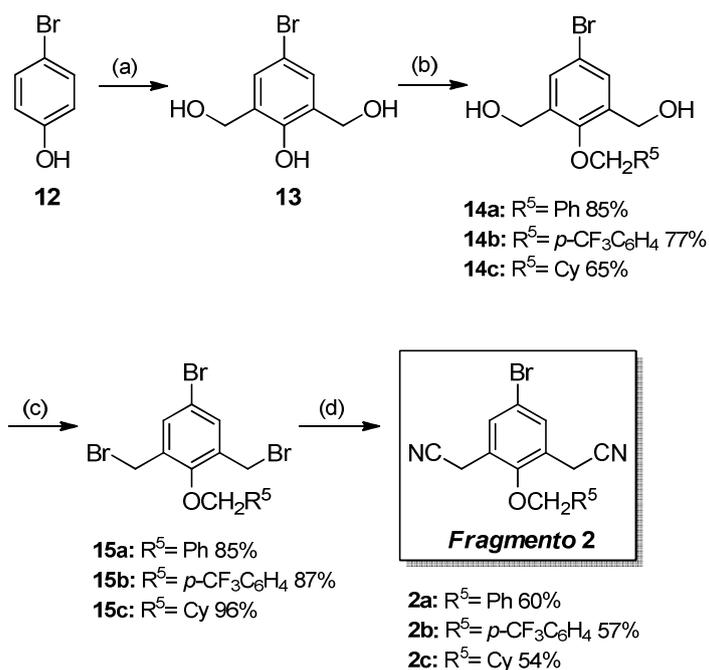
Los fragmentos de partida **1** y **2** fueron piezas clave para la introducción de la agrupación amínica en la molécula final. El fragmento **1** se preparó a partir del reactivo comercial 4-bromo-3,5-dimetilfenol (**6**). El grupo fenol de **6** se alquiló con yodometano y, a continuación, se llevó a cabo la oxidación del éster metílico resultante. La esterificación del ácido carboxílico **8** dio lugar al compuesto **9**, cuya posterior reducción con LiBH_4 (borohidruro de litio), seguida del tratamiento con NBS (*N*-bromosuccinimida) y NaCN (cianuro sódico) originó el fragmento **1** con buen rendimiento (Esquema 2).



Reactivos y condiciones: (a) CH_3I , K_2CO_3 , acetona, reflujo, 12 h, cuantitativo; (b) KMnO_4 , $t\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$, 100°C , 18 h, 68%; (c) MeOH , H_2SO_4 , temp. ambiente, 12 h, 85%; (d) LiBH_4 , THF, temp. ambiente, 12 h, 95%; (e) NBS , PPh_3 , THF, temp. ambiente, 12 h, 85%; (f) NaCN , KI, éter 18-corona-6, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, temp. ambiente, 24 h, 68%.

Esquema 2

La síntesis del fragmento 2 se muestra en el Esquema 3. La reacción entre el reactivo comercial 12 con formaldehído dio lugar al alcohol 13. La posterior protección selectiva del grupo fenol en el compuesto 13 originó los intermedios 14a-c. La bromación de los derivados 14 seguida de la sustitución nucleófila con NaCN llevó a la obtención de una pequeña quimioteca de derivados 2 bromofenólicos O-protegidos.



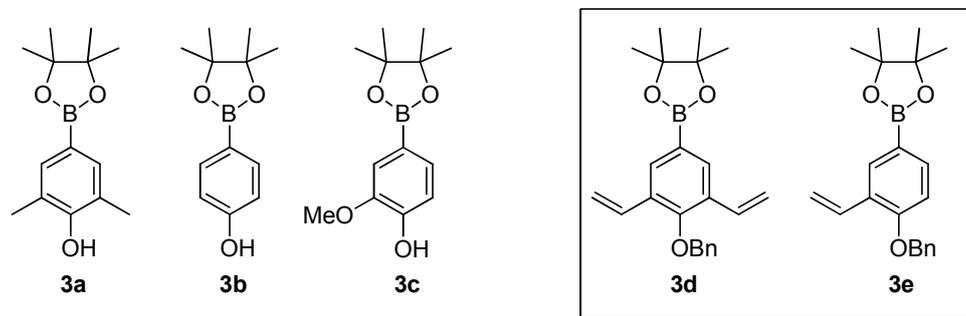
Reactivos y condiciones: (a) HCHO, aq NaOH 25%, 40 °C, 48 h, 51%; (b) BrCH₂R⁵, K₃PO₄, acetona, temp. ambiente, 12 h; (c) NBS, PPh₃, THF, temp. ambiente, 24 h; (d) NaCN, KI, éter 18-corona-16, CH₃CN:H₂O, temp. ambiente, 24 h.

5

Esquema 3

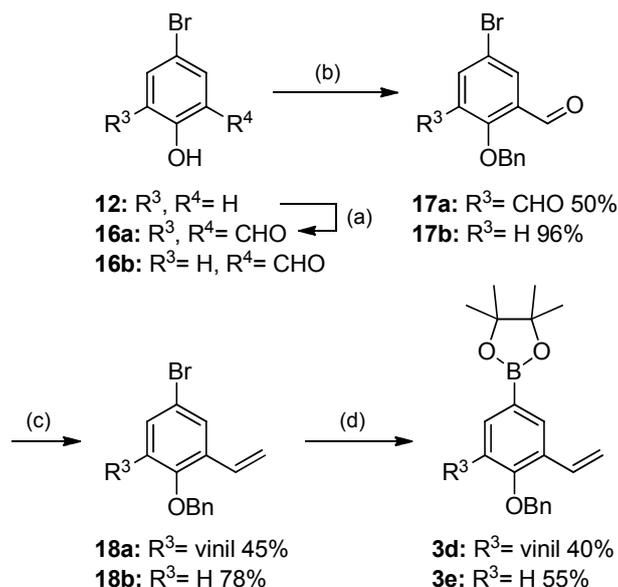
Como se mencionó anteriormente, la ruta sintética propuesta se basa en una secuencia de reacciones de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki mediante el empleo de diferentes ésteres aril borónicos. Los ésteres borónicos **3** utilizados proceden de fuentes comerciales a excepción de **3d** y **3e**.

Ésteres borónicos comerciales



10

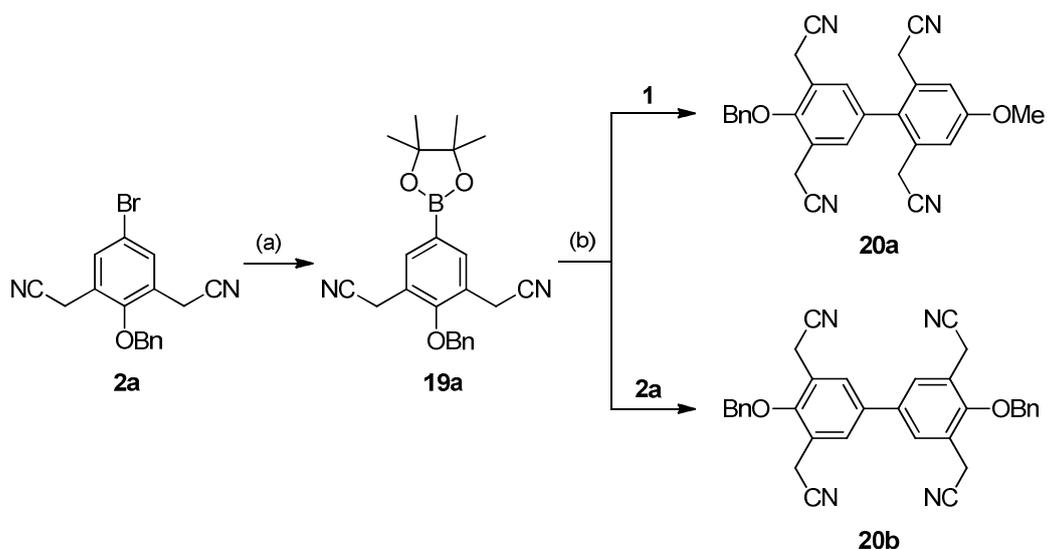
Los derivados vinílicos **3d** y **3e** se sintetizaron tal como se muestra en el Esquema 4. En primer lugar, se preparó el dialdehído **16a** mediante la reacción de Duff a partir de 4-bromofenol comercial. Ambos precursores **16a** y **16b** siguieron la misma ruta sintética que consistió en la protección del fenol con bencilo (Bn), posterior reacción de Wittig con MePh₃PBr, y por último, formación del éster borónico catalizada por paladio mediante radiación por microondas.



Reactivos y condiciones: (a) *Reacción de Duff*, TFA, hexametilentetramina, 150 °C, 48 h, 50%; (b) BrBn, K₃PO₄, acetona, reflujo, 8 h; (c) MePh₃PBr, NaH, THF, 0 °C, 16 h; (d) bis(pinacolato) de boro, KOAc, PdCl₂(dppf), dioxano, 30 min, 120 °C MW.

Esquema 4

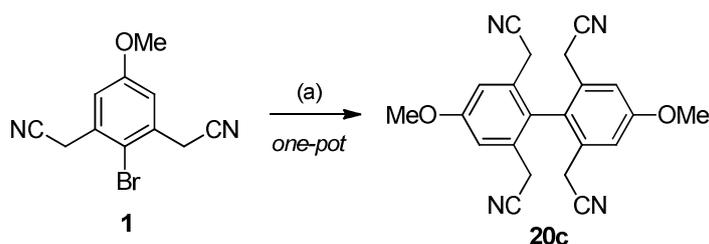
Una vez preparados los sustratos de partida, se desarrolló la síntesis complementaria de sistemas bifenílicos combinando los fragmentos **1** y **2** (Esquema 5). De ese modo, aunque las moléculas objetivo fueran más complejas, fue posible evaluar la afinidad por el ARN viral y la actividad inhibitoria de las estructuras biarílicas.



Reactivos y condiciones: (a) bis(pinacolato) de boro, KOAc, PdCl₂(dppf), DME, 30 min, 120 °C MW, 60%; (b) Pd(OAc)₂, PPh₃, K₃PO₄, DMSO, 1-2 h, 125 °C MW, **20a** 42%, **20b** 44%.

Esquema 5

- 5 Como se muestra en el Esquema 5, el intermedio **19a** se obtuvo a través de una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio entre el compuesto **2a** y bis(pinacolato) de boro. Un posterior acoplamiento de éster borónico **19a** con los fragmentos **1** y **2a** dio lugar a los bifenilos **20a** y **20b** respectivamente. Además, se pudo observar que la reacción de homo-acoplamiento de **1** era posible a través de un proceso *one-pot* en el cual el intermedio borónico se formaba *in situ* (Esquema 6).

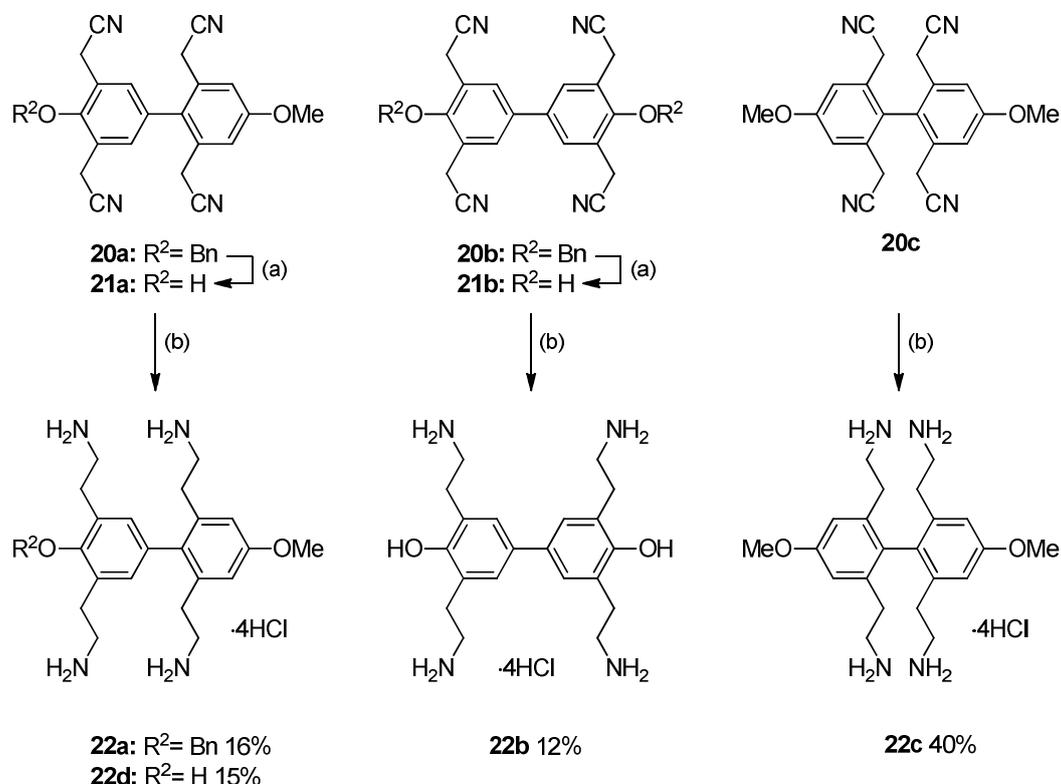


Reactivos y condiciones: (a) bis(pinacolato) de boro, K₃PO₄, PdCl₂(dppf), DME, 60 min, 125 °C MW, 84%.

Esquema 6

- 15 El siguiente paso de la secuencia sintética consistió en el tratamiento de los nitrilos **20a-c** con una disolución del complejo de boro tetrahidrofurano seguido de HCl 4M en dioxano

para dar las sales de amonio **22a-b** (Esquema 7). Adicionalmente, los derivados bencilados **20a-b** se sometieron a una hidrólisis previa para dar los alcoholes **21a-b**.



Reactivos y condiciones: (a) Pd/C (10 mol%), H₂ 1 atm, temp. ambiente, 2 h, cuantitativo; (b)

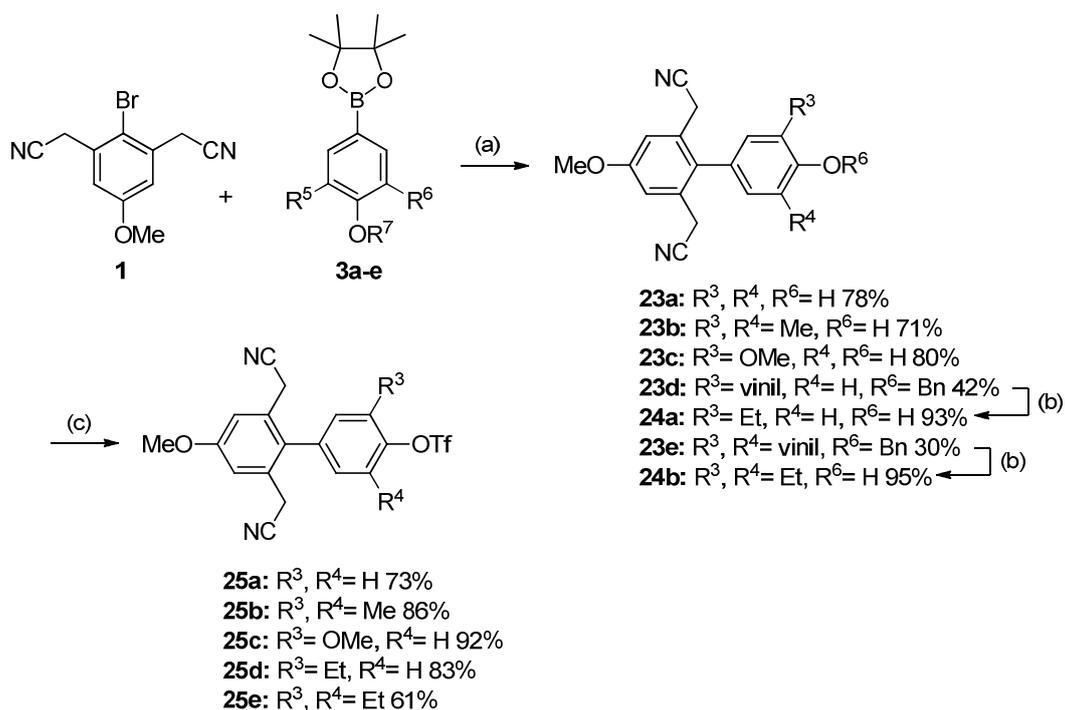
5 BH₃, THF, reflujo, 5 días entonces HCl 4 M en dioxano.

Esquema 7

Basándose en la estrategia sintética propuesta, el terfenilo deseado **5** se preparó como se indica a continuación. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki entre el sintón de partida **1** y los distintos ésteres aril borónicos **3a-e** empleando las condiciones de reacción optimizadas (Esquema 8). La eliminación del grupo bencilo en los compuestos **23d-e** y la posterior transformación de los fenoles **23a-c** y **24a-b** en sus correspondientes triflatos, generó **25a-e** con buenos rendimientos. Por otra parte, la preparación de los ésteres borónicos **19b-d** (Esquema 9), previa al acoplamiento con los triflatos **25**, se llevó a cabo mediante una reacción de acoplamiento con bis(pinacolato) de boro catalizada por paladio bajo radiación microondas, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para **2a** (R⁵ = Ph).

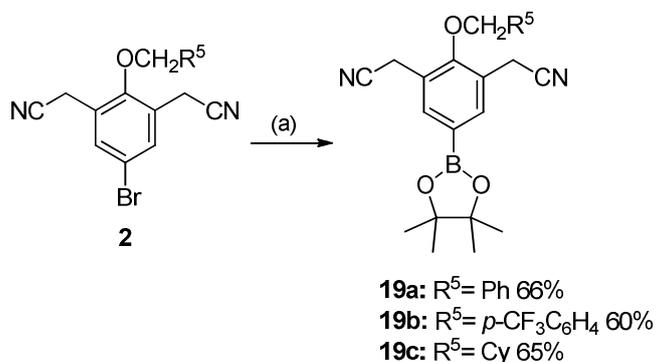
10

15



Reactivos y condiciones: (a) K₃PO₄, PdCl₂(dppf), CH₃CN:H₂O (7:3), 30 min, 120 °C MW; (b) H₂, Pd(OH)₂, EtOH, temp. ambiente, 12 h; (c) Tf₂O, pyridine, CH₂Cl₂, temp. ambiente, 2 h.

Esquema 8



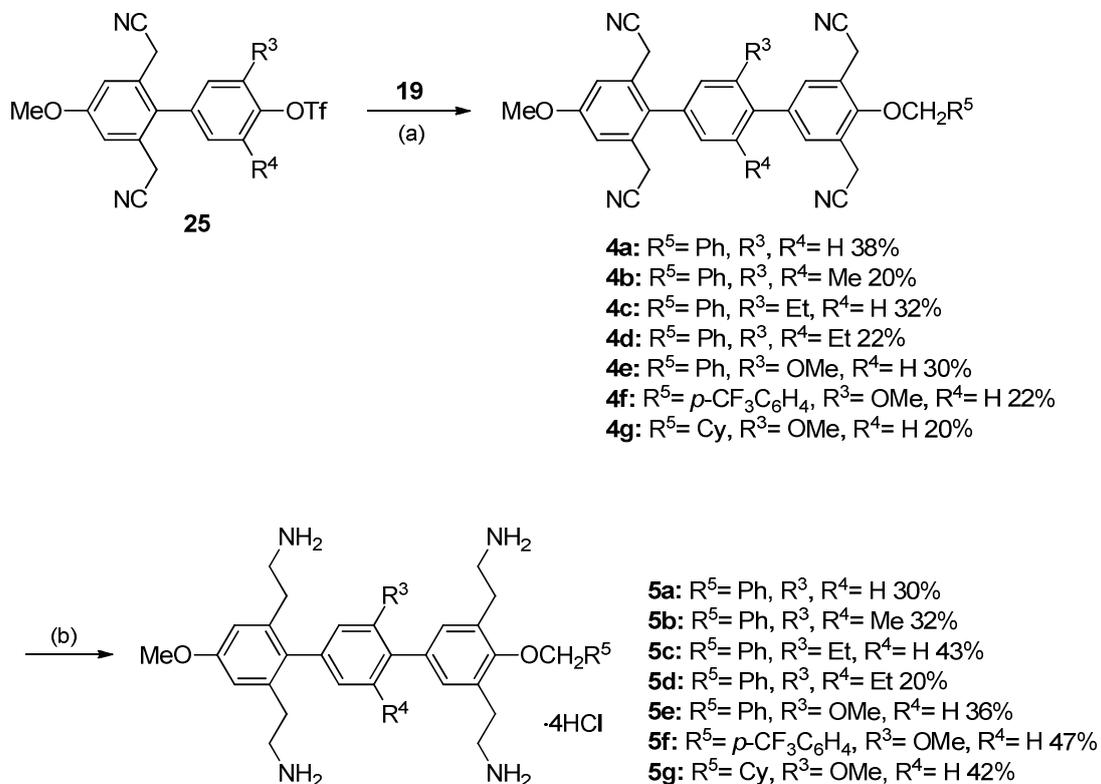
5

Reactivos y condiciones: (a) bis(pinacolato)de boro, KOAc, PdCl₂(dppf), dioxano, 30 min, 120 °C MW.

Esquema 9

A continuación, un último acoplamiento de Suzuki entre los triflatos **25** y los ésteres borónicos **19** generó los derivados terfenílicos deseados **4a-g**, los cuales fueron

transformados en sus correspondientes sales de amonio **5** por medio de una reducción con BH_3/THF seguida de un tratamiento con HCl 4M en dioxano.

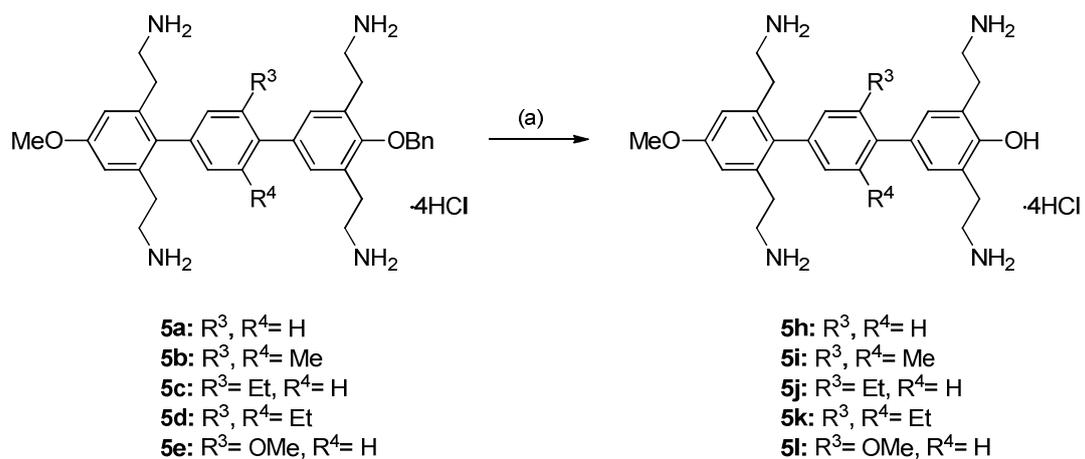


Reactivos y condiciones: (a) K_3PO_4 , $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (7:3), 30 min, 120 °C MW; (b)

5 BH_3 , THF, reflujo, 5 días entonces HCl 4 M en dioxano.

Esquema 10

Adicionalmente, se procedió a eliminar el grupo bencilo de los derivados **4a-e** empleando condiciones estándar de reacción para dar las sales de amonio correspondientes **5h-i** de forma cuantitativa, tal como se muestra en el Esquema 11. De esta manera, se ha
 10 preparado una variada quimioteca de bi- y terfenilos estratégicamente funcionalizados con el fin de evaluar su afinidad por el ARN viral y actividad inhibitoria frente al virus VIH-1.



Reactivos y condiciones: (a) Pd/C (10 mol%), H₂ 1 atm, temp. ambiente, 2 h, cuantitativo.

Esquema 11

Bibliografia

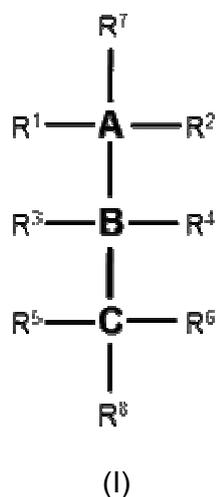
1. Richman, D.D. et al. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304-7 (2009).
- 5 2. Ward, C.J. New drugs for HIV-1: challenges and novel candidates. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**, 1093-5 (2010).
3. Sharp, P.A. The centrality of RNA. *Cell* **136**, 577-80 (2009).
4. Gallego, J. & Varani, G. Targeting RNA with Small Molecule Drugs: Therapeutic Promise and Chemical Challenges. *Acc. Chem. Res.* **34**, 836-843 (2001).
- 10 5. Hermann, T. Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 355-66. (2005).
6. Battiste, J.L. et al. a Helix-RNA Major Groove Recognition in an HIV-1 Rev Peptide-RRE RNA Complex. *Science* **273**, 1547-1551 (1996).
7. Daugherty, M.D., Booth, D.S., Jayaraman, B., Cheng, Y. & Frankel, A.D. HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12481-6 (2010).
- 15 8. DiMattia, M.A. et al. Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5810-4 (2010).
9. Pollard, V.W. & Malim, M.H. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532 (1998).
- 20 10. Pond, S.J., Ridgeway, W.K., Robertson, R., Wang, J. & Millar, D.P. HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1404-8 (2009).
11. Groom, H.C., Anderson, E.C. & Lever, A.M. Rev: beyond nuclear export. *J Gen Virol* **90**, 1303-18 (2009).
- 25 12. Blissenbach, M., Grewe, B., Hoffmann, B., Brandt, S. & Uberla, K. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J Virol* **84**, 6598-604 (2010).
13. Yin, H. et al. Terphenyl-based helical mimetics that disrupt the p53/HDM2 interaction. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 2704-2707 (2005).
- 30 14. Suzuki, A. Carbon-carbon bonding made easy. *Chem. Commun.*, 4759-4763 (2005).
15. Leadbeater, N. Fast, easy, clean chemistry by using water as a solvent and microwave heating: the Suzuki coupling as an illustration. *Chem. Commun.*, 2881-2902 (2005).

16. Nicolaou, K.C., Bulger, P.G. & Sarlah, D. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in Total Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 4442-4489 (2005).
17. Tanious, F.A., Nguyen, B. & Wilson, W.D. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Methods Cell Biol* **84**, 53-77 (2008).
- 5 18. Dingwall, C. et al. HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* **9**, 4145-53 (1990).
19. Gonzalez-Bulnes, L. & Gallego, J. Analysis of mixed DNA-bisnaphthalimide interactions involving groove association and intercalation with surface-based and solution methodologies. *Biopolymers* doi: **10.1002/bip.22114**(2012).
- 10 20. Kjems, J., Calnan, B.J., Frankel, A.D. & Sharp, P.A. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J* **11**, 1119-29 (1992).
21. Tan, R., Chen, L., Buettner, J.A., Hudson, D. & Frankel, A.D. RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* **73**, 1031-40 (1993).
- 15 22. Lacourciere, K.A., Stivers, J.T. & Marino, J.P. Mechanism of neomycin and Rev peptide binding to the Rev responsive element of HIV-1 as determined by fluorescence and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 5630-41 (2000).
23. Hendrix, M., Priestley, E.S., Joyce, G.F. & Wong, C.H. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc* **119**, 3641-8 (1997).
- 20 24. Halgren, T.A. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **17**, 490-519 (1996).
25. Moustakas, D.T. et al. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **20**, 601-619 (2006).
- 25 26. Morris, G.M. et al. Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comp. Chem.* **19**, 1639-1662 (1998).
27. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W. & Taylor, R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **52**, 609-23. (2003).
- 30 28. Detering, C. & Varani, G. Validation of automated docking programs for docking and database screening against RNA drug targets. *J Med Chem* **47**, 4188-201. (2004).
29. Cornell, W.D. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197 (1995).

30. Gasteiger, J. & Marsili, M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity - a Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-3228 (1980).
31. Ippolito, J.A. & Steitz, T.A. The structure of the HIV-1 RRE high affinity rev binding site at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* **295**, 711-7 (2000).
- 5 32. Hung, L.-W., Holbrook, E.L. & Holbrook, S.R. The Crystal Structure of the Rev Binding Element of HIV-1 Reveals Novel Base Pairing and Conformational Variability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5107-5112 (2000).
33. Gosser, Y. et al. Peptide-Triggered Conformational Switch in HIV1-RRE RNA Complexes. *Nature Struct. Biol.* **8**, 146-152 (2001).
- 10 34. Zhang, Q., Harada, K., Cho, H.S., Frankel, A.D. & Wemmer, D.E. Structural characterization of the complex of the Rev response element RNA with a selected peptide. *Chem Biol* **8**, 511-20 (2001).
35. Nguyen, B., Tanius, F.A. & Wilson, W.D. Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. *Methods* **42**, 150-61
- 15 (2007).
36. Myszka, D.G. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* **12**, 279-84 (1999).
37. Goddard, T.D. & Kneller, D.G. Sparky 3.110. *University of California, San Francisco, USA* (2004).
38. Peterson, R.D., Bartel, D.P., Szostak, J.W., Horwath, S.J. & Feigon, J. 1H NMR
- 20 Studies of the High-Affinity Rev Binding Site of the Rev Responsive Element of HIV-1 mRNA: Base Pairing in the Core Binding Element. *Biochemistry* **33**, 5357-5366 (1994).
39. Luedtke, N.W. & Tor, Y. Fluorescence-based methods for evaluating the RNA affinity and specificity of HIV-1 Rev-RRE inhibitors. *Biopolymers* **70**, 103-19 (2003).
- 25 40. Adachi, A. et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**, 284-91 (1986).
41. Garcia-Perez, J., Sanchez-Palomino, S., Perez-Olmeda, M., Fernandez, B. & Alcami, J. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug
- 30 susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol* **79**, 127-37 (2007).
42. Harada, S., Koyanagi, Y. & Yamamoto, N. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**, 563-6 (1985).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula general (I)



5

donde:

10 A, B y C representan independientemente uno del otro anillos de seis átomos seleccionados del grupo que consiste en benceno, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, ciclohexano, oxano, piperidina y piperazina,

15 los anillos de seis átomos A, B y C están unidos en *para* mediante enlaces simples,

los sustituyentes R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ ocupan posiciones *orto* o *meta* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

20 los sustituyentes R⁷ y R⁸ ocupan posiciones *para* respecto a los átomos que enlazan entre sí los anillos de seis miembros,

25 R¹ y R² ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil

amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

5 R^3 y R^4 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

10 R^5 y R^6 ocupan posiciones bilaterales (1,3 ó 1,4 disustituidas una respecto a la otra) en el anillo de seis átomos y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo,

15 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquil amina, alquil guanidina, alquil amida, alquil éster, alquil carboxilato, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo, alquilo, aril alcoxi y aril éster,

20 y sus sales, ésteres, isómeros, solvatos, hidratos y profármacos.

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en la
Fórmula general (I)

25 A, B y C son benceno,

R^1 y R^2 ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *meta* respecto al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos
30 aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, substituidos o no substituidos,

R^3 y R^4 ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto al carbono de su anillo unido al benceno A, y se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno,

halógeno, hidroxilo, (C1-C6) alcoxi, (C1-C6) alquil amida sustituida o no sustituida, (C1-C6) alquil ester sustituido o no sustituido, (C1-C6) hidroxialquilo, (C1-C6) haloalquilo, (C1-C6) alcoxialquilo, y (C1-C8) alquilo,

5 R⁵ y R⁶ ocupan posiciones bilaterales 1,3 disustituidas una respecto a la otra y *orto* respecto al carbono de su anillo unido al benceno B, y son grupos aminometilo, aminoetilo o aminopropilo, substituidos o no substituidos,

10 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente uno del otro de un grupo consistente en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, (C1-C10) alcoxi, (C1-C10) alquil amina, (C1-C10) alquil guanidina, (C1-C10) alquil amida, (C1-C10) alquil éster, (C1-C10) hidroxialquilo, (C1-C10) alcoxialquilo, (C1-C10) haloalquilo, (C1-C10) alquilo, aril alcoxi, y aril éster.

15 y sus sales, ésteres, isómeros, solvatos, hidratos y profármacos.

3. Compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por estar seleccionado del grupo que comprende:

20 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-4"-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-2',4"-dimetoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 2,2',2",2"'-(4"-(benciloxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetrail)tetraetilamina
 2,2',2",2"'-(3',4-dimetoxi-4"-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)-[1,1':4',1"-terfenil]-
 25 2,3",5",6-tetrail)tetraetilamina
 2,2',2",2"'-(4"-(ciclohexilmetoxi)-3',4-dimetoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetrail)tetraetilamina
 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-4"-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 2,2',2",2"'-(4"-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetrail)tetraetilamina
 30 2",3,5,6"-tetrakis(2-aminoetil)-2'-etil-4"-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 2,2',2",2"'-(4"-(benciloxi)-3'-etil-4-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetrail)tetraetilamina

2'',3,5,6''-tetrakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-
tetraetil)tetraetilamina,
y sus sales, esteres, isómeros, solvatos, hidratos y profármacos.

5

4. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como medicamento.

10

5. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y/o otras enfermedades causadas por otros virus ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la modulación de la función de bucles internos de ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la inhibición o mimetismo de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

15

6. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones causadas por virus ARN.

20

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el tratamiento profiláctico y/o terapéutico esta destinado al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

25

8. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de, enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la modulación de la función de bucles internos de ARN.

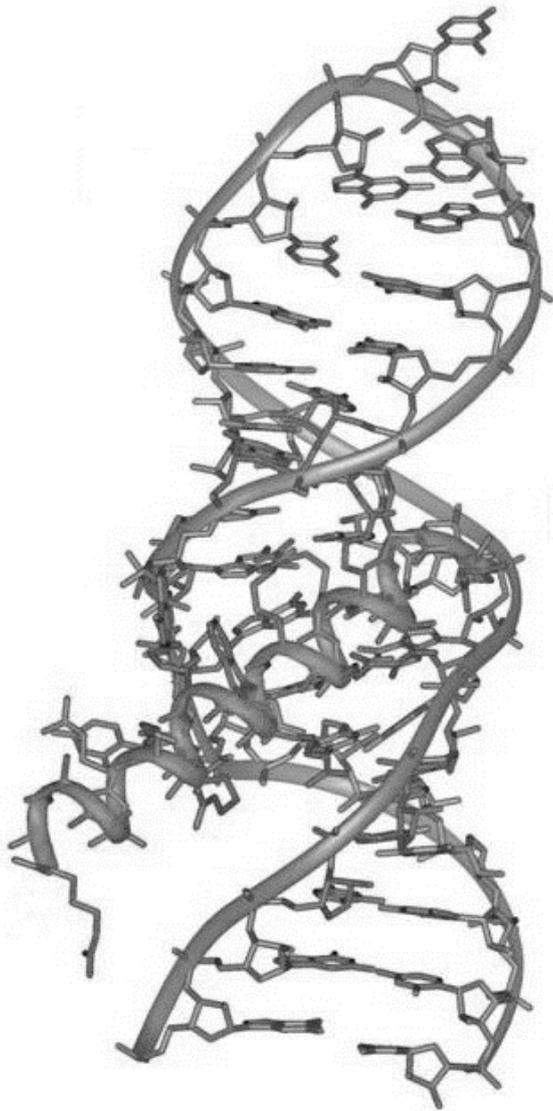
30

9. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la inhibición

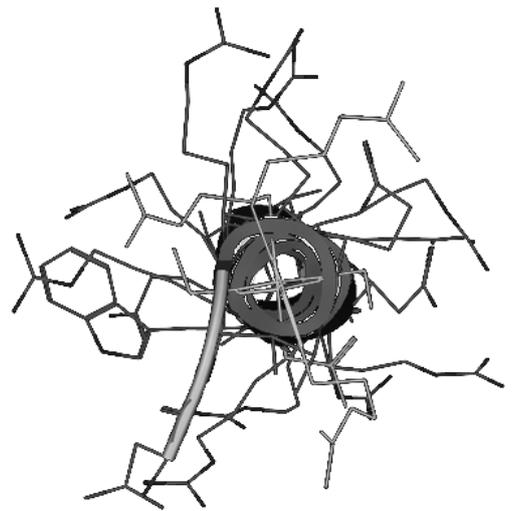
o mimetismo de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

- 5 10. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de Fórmula general (I), de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o su sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato, isómero, hidrato o profármaco y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 11. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y/o enfermedades causadas por otros virus ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la modulación de la función de bucles internos de ARN, y/o enfermedades infecciosas o crónicas responsivas a la inhibición o mimetismo de dominios proteicos de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.
- 15 12. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11 caracterizada por contener de 0,05% - 80% (en peso) de al menos un compuesto de Fórmula general (I).
- 20 13. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 formulada para su administración parenteral, oral, tópica, nasal y/o rectal.
- 25 14. Método de obtención de los compuestos de Fórmula general (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la formación de sucesivos enlaces C-C por acoplamientos de Suzuki entre halogenuros, ariltriflatos y ésteres borónicos de los anillos de 6 miembros A, B y C conteniendo grupos bilaterales, catalizados por paladio, caracterizado por qué los derivados halogenuro de A y C introducen R¹, R², R⁵, y R⁶ y el éster borónico de B introduce R³ y R⁴ en los compuestos de Fórmula general (I).
- 30

FIG.1

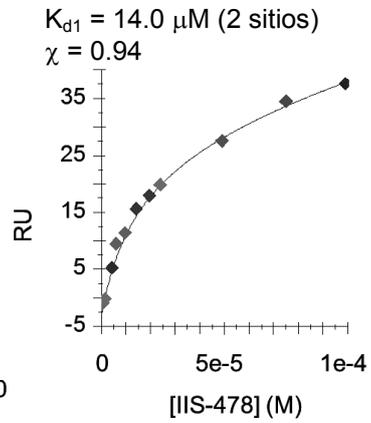
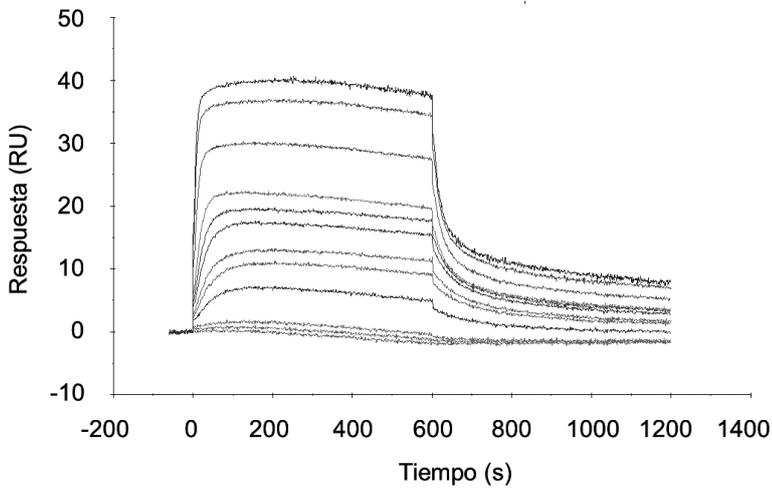


a

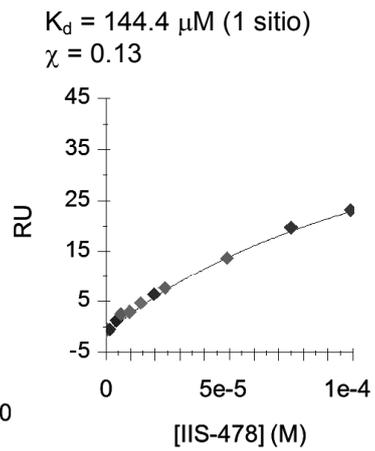
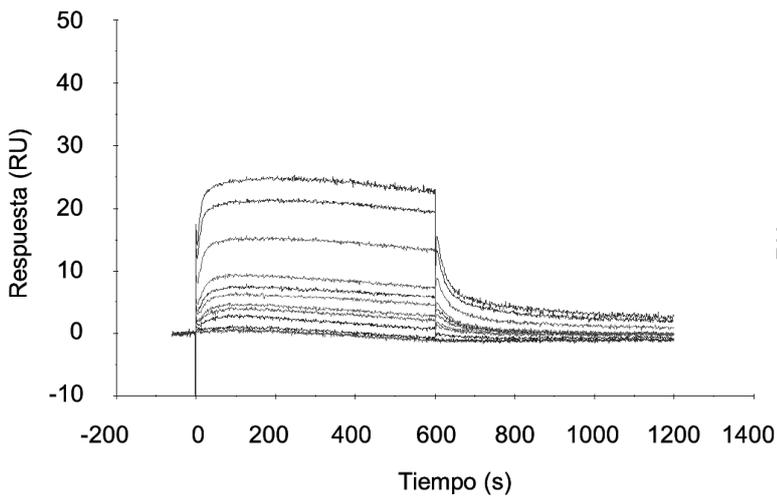


b

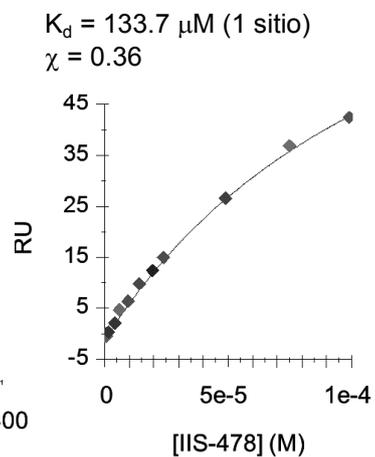
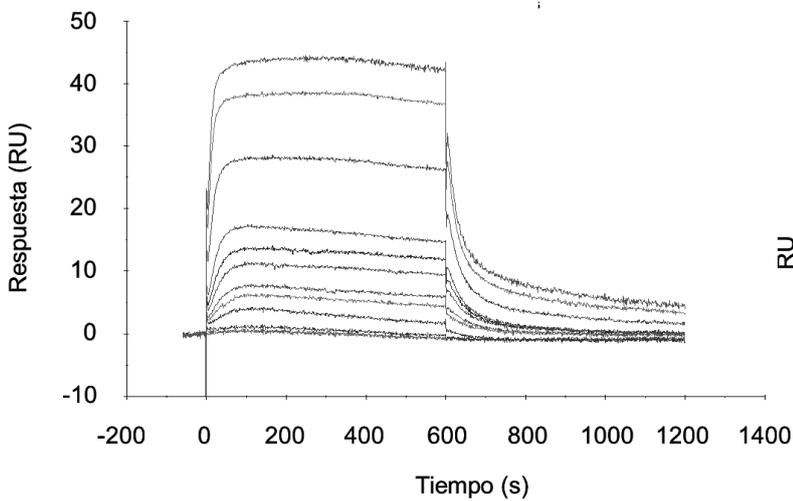
FIG. 2



RRE

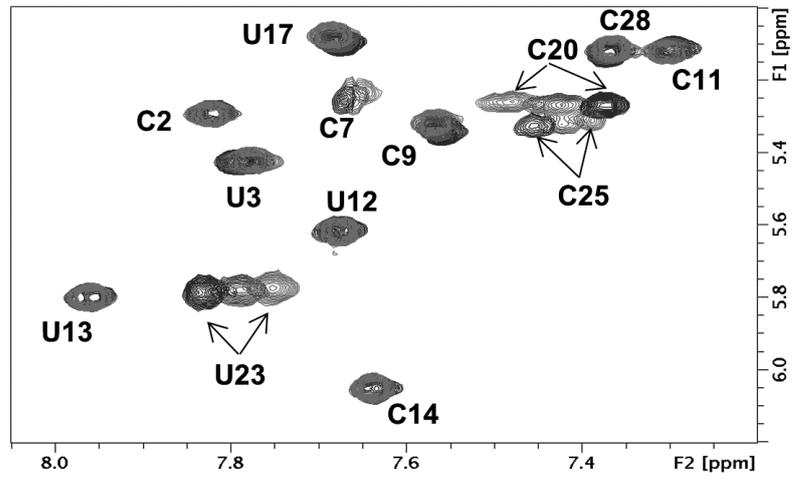


RREc

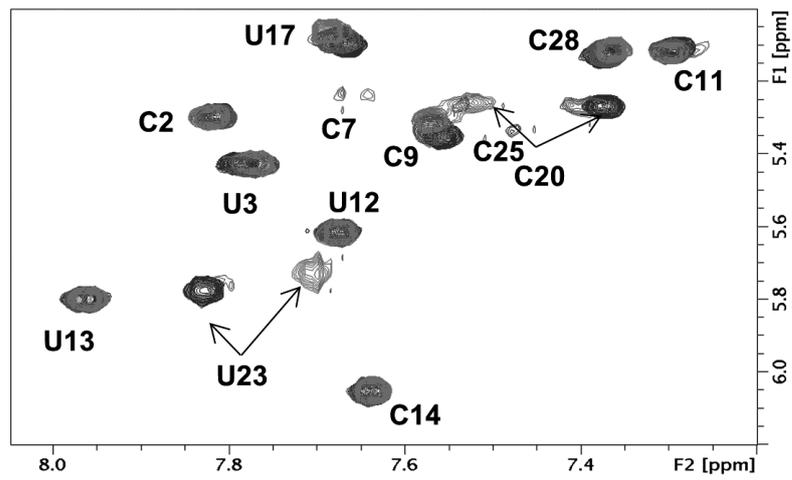


TARc

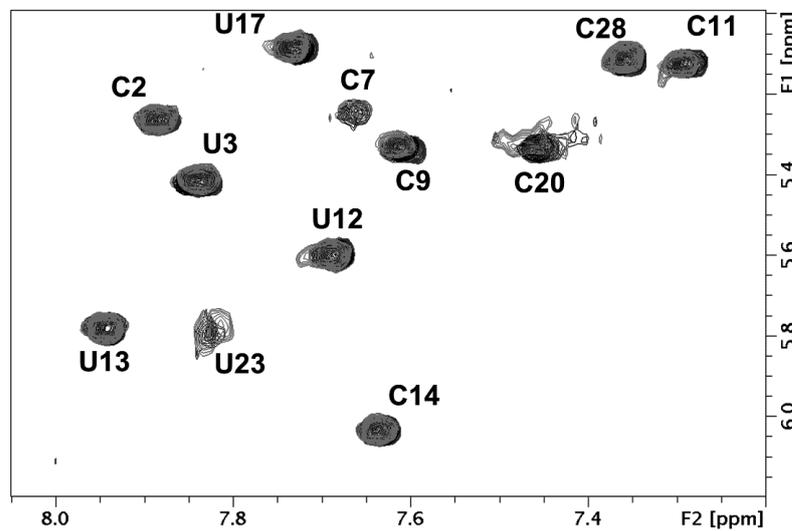
FIG. 3



RRE:IIS-420, 1:0, 1:1, 1:2



RRE:IIS-806, 1:0, 1:1, 1:2



RRE:JB-398 1:0, 1:1, 1:2, 1:6

FIG. 4

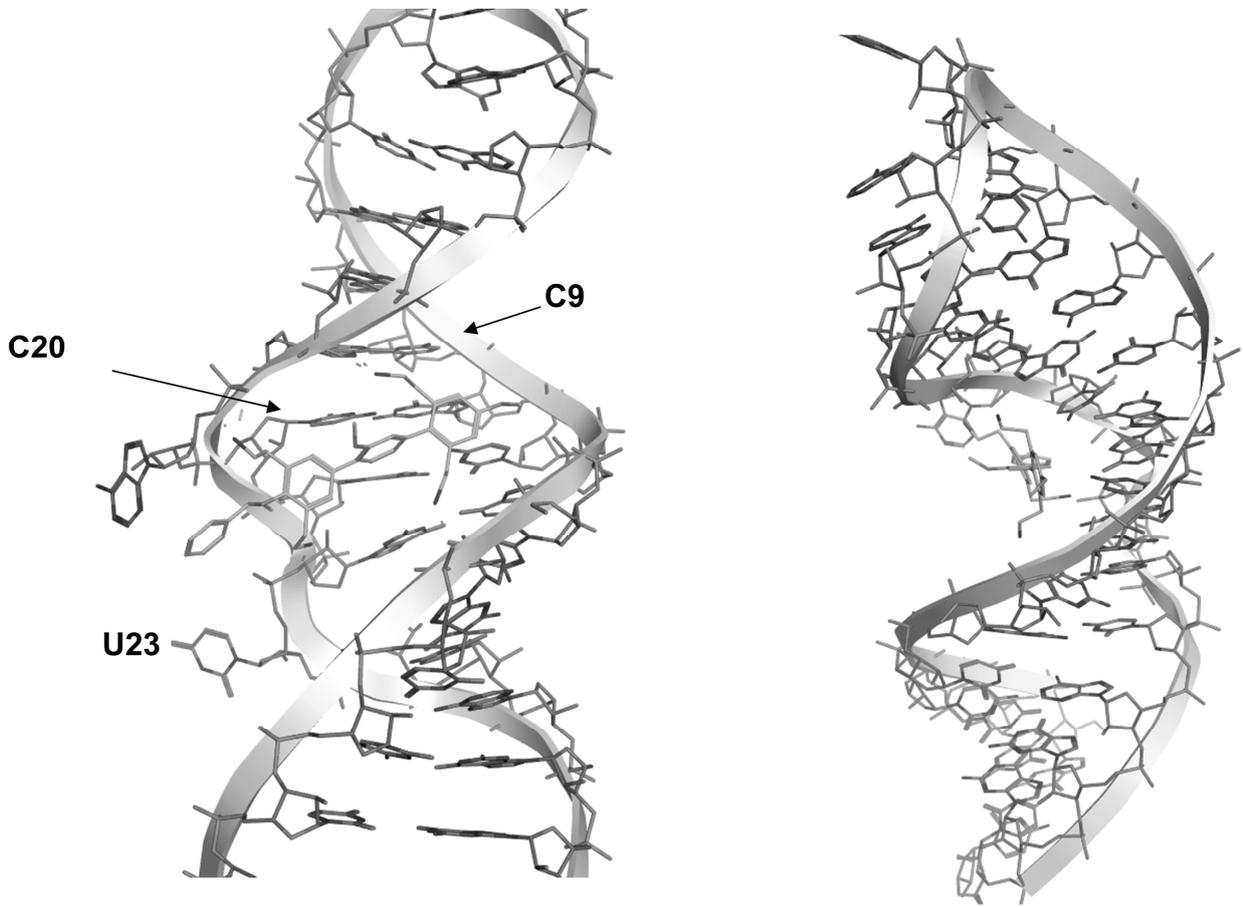


FIG. 5

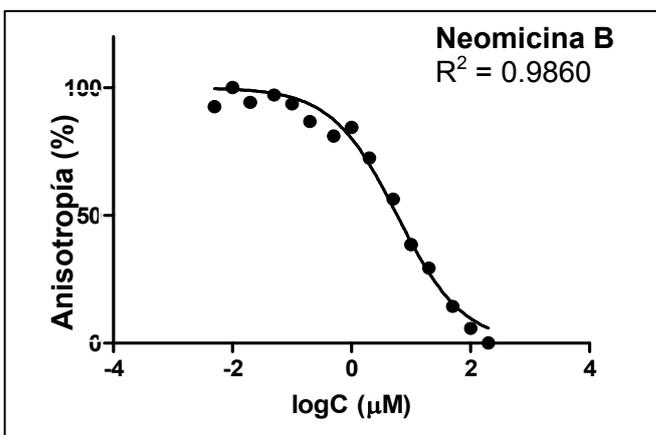
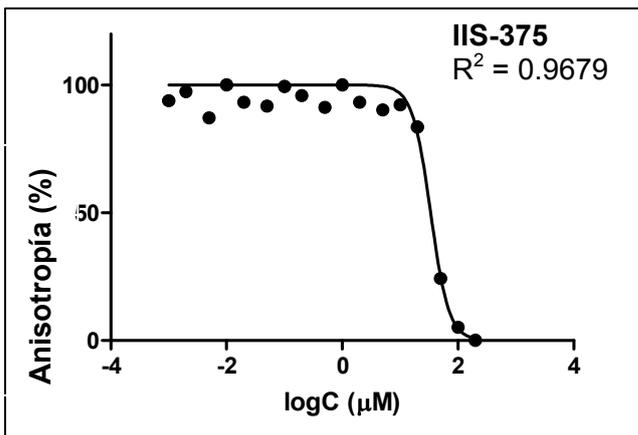
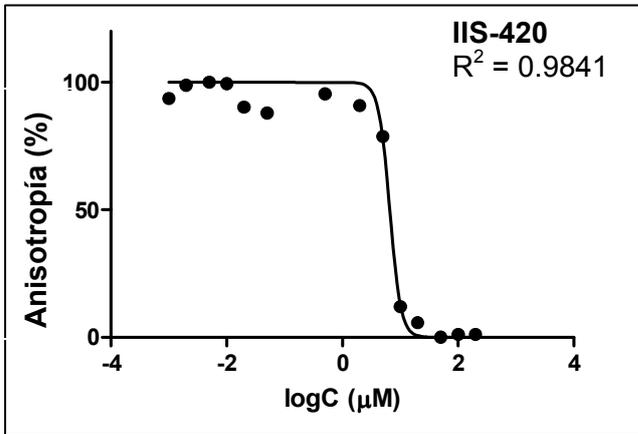


FIGURA 6A

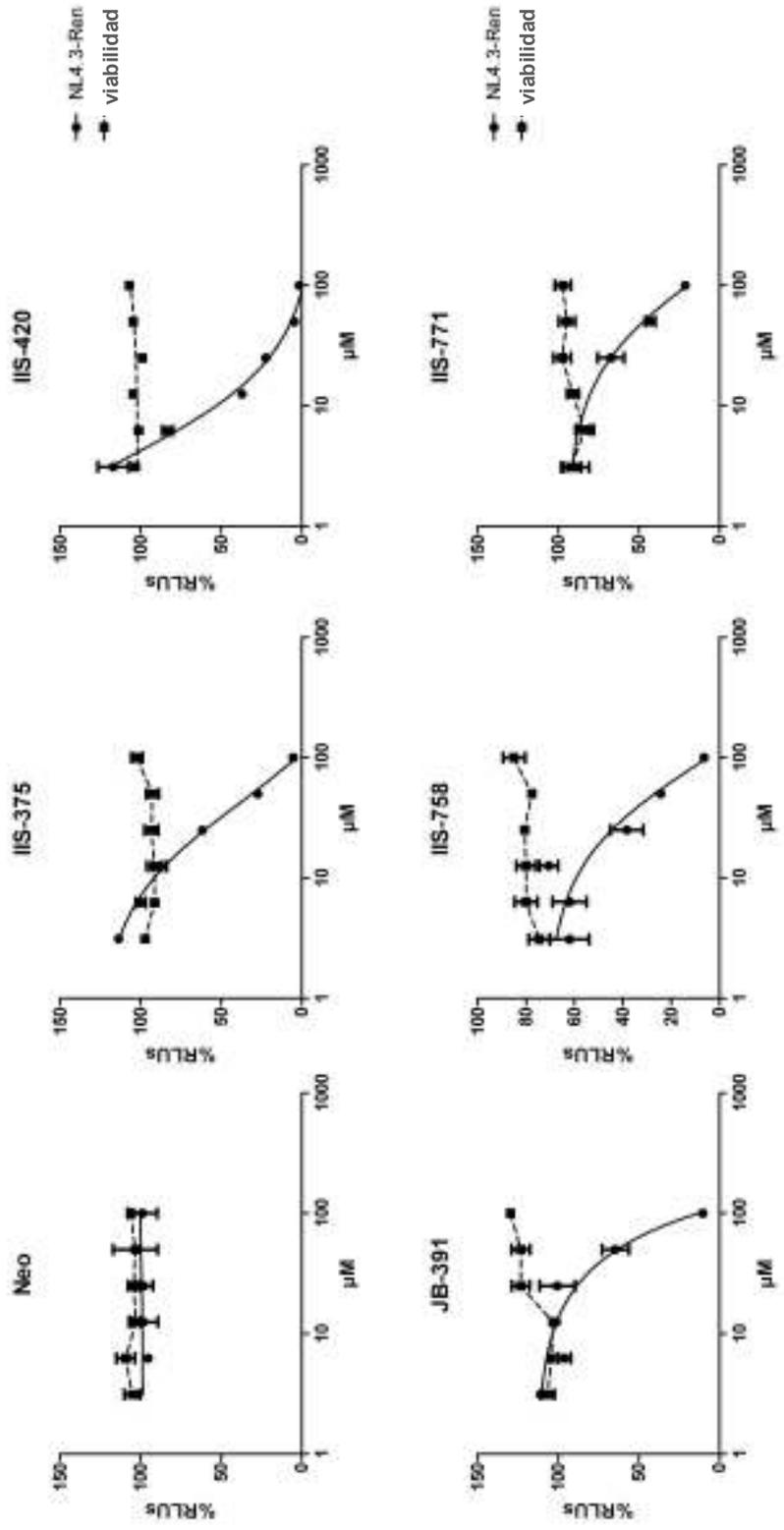
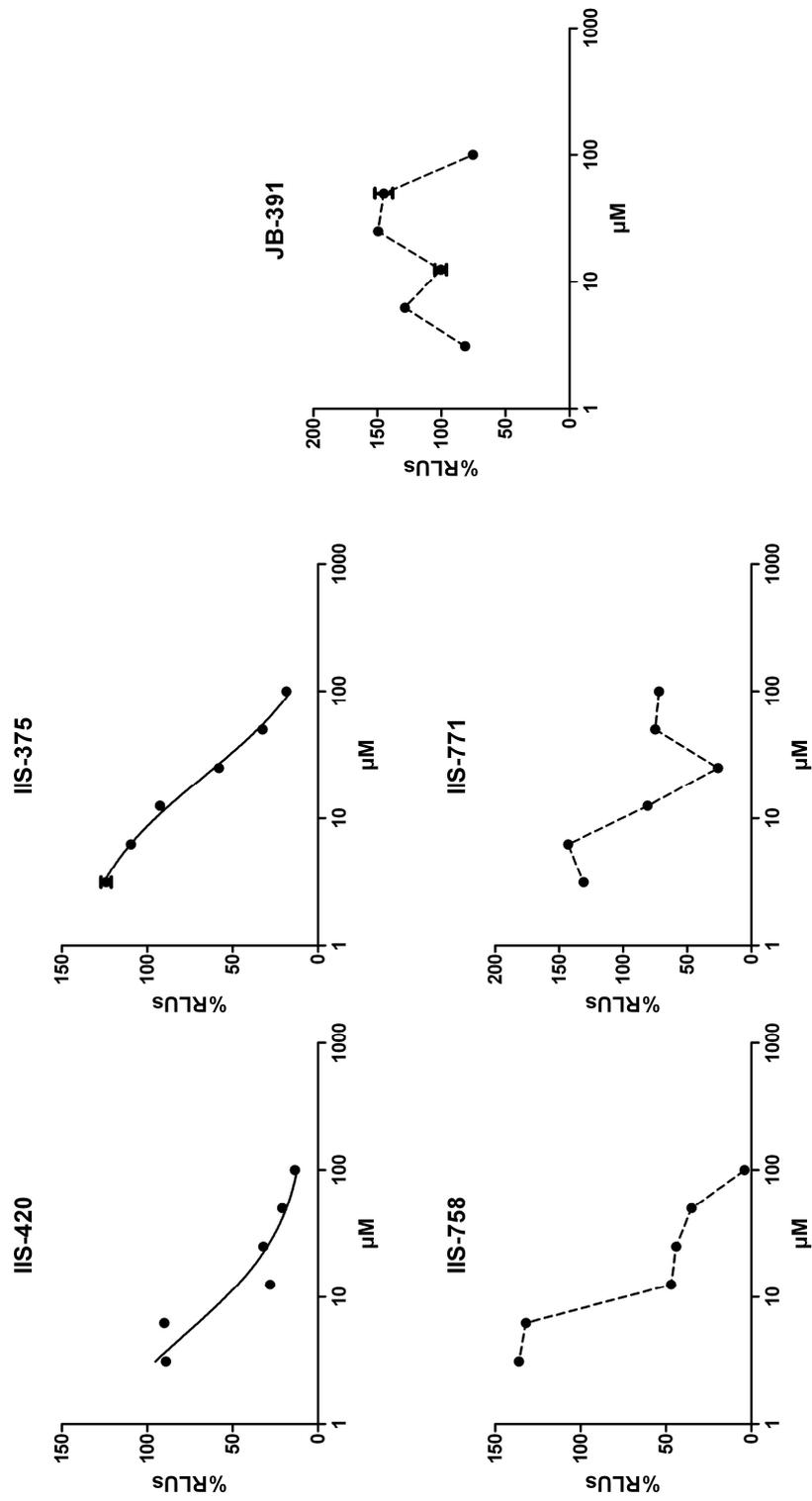


FIGURA 6B



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INVESTIGACION PRNCIPE FELIPE
 INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
 UNIVERSIDAD CATLICA DE VALENCIA SAN VICENTE MRTIR (
 UNIVERSITAT DE VALNCIA

<120> NUEVOS p-TERFENILOS HEXAKIS-SUSTITUIDOS CON GRUPOS BILATERALES PARA EL
 TRATAMIENTO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1) Y
 OTRAS ENFERMEDADES

<130> VIH1

<160> 5

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
 <211> 28
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..28
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="GCUGGGCGCACUUCGGUGACGGUACAGC"
 /mol_type="unassigned RNA"

<400> 1
 gcugggcgca cuucggugac gguacagc 28

<210> 2
 <211> 26
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..26
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="GCUGGGCGGACUUCGGUGCGCCCAGC"
 /mol_type="unassigned RNA"

<400> 2
 gcugggcgga cuucggugcg cccagc 26

ES 2 489 815 A1

<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /organism="Artificial Sequence"
/note="GCUGAUCUGACACUUCGGUGUCUCAGC"
/mol_type="unassigned RNA"

<400> 3
gcugaucuga cacuucggug ucucagc

27

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TRQARRNRRRRWRERQRAAAAR

<400> 4
Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
1 5 10 15
Arg Ala Ala Ala Ala Arg
 20

<210> 5
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FITCGTRQARRNRRRRWRERQRAAAAR

<400> 5
Phe Ile Thr Cys Gly Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Trp Arg Glu Arg Gln Arg Ala Ala Ala Ala Arg
 20 25



- ②① N.º solicitud: 201330235
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.02.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CLOUSER, C.L. et al. "Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine". Biological & Medicinal Chemistry Letters 2012, Volumen 22, páginas 6642-6646. [Disponible en línea el 06.09.2012]. Ver página 6642, resumen; página 6643, figura 1; página 6644, columna 1, párrafos 1-2; esquema 2; página 6645, columna 2, párrafo 3; tablas 1 y 2.	1,4-14
X	US 20110046147 A1 (HARTMANN, R. et al.) 24.02.2011, párrafo [0001]; ejemplo 107, párrafos [0301],[0302]; ejemplo 109, párrafos [0305],[0306]; ejemplo 111, párrafos [0309],[0310]; ejemplo 113, párrafos [0313],[0314]; ejemplo 127, párrafos [0339],[0340]; ejemplo 127, párrafos [0341],[0342]; reivindicaciones 10,14.	1,4,5,10-14
X	STEVENS, C.B. et al. "Synthesis of tetrahydroxybiphenyls and tetrahydroxyterphenyls and their evaluation as amyloid- β aggregation inhibitors". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013, Volumen 23, páginas 1703-1706. [Disponible en línea el 04.02.2013]. Ver página 1703, resumen; página 1704, esquema 1.	1,4,5,10-14
X	TSYGANKOVA, I.G. & ZHENODAROVA, S.M. "The Structure-Activity Correlation in a Series of Stilbene Derivatives and Related Compounds, the Inducers of Apoptosis". Russian Journal of General Chemistry 2011, Volumen 81, Número 5, páginas 913-919. Ver página 913, resumen; página 915, tabla 1.	1,4,5,10-13
X	ORTEGA, A. et al. "Synthesis and evaluation of arylquinones as BACE1 inhibitors, β -amyloid peptide aggregation inhibitors, and destabilizers of preformed β -amyloid fibrils". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011, Volumen 21, páginas 2183-2187. [Disponible en línea el 13.03.2011]. Ver página 2183, resumen; página 2184, figura 1.	1,4,5,10-13
A	SINGH, S.B. et al. "Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2003, Volumen 30, páginas 721-731. [Disponible en línea el 09.01.2004]. Ver página 721, resumen; página 727, compuestos 8 y 9; página 728, tabla 1.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.12.2013

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C217/60 (2006.01)

C07C213/08 (2006.01)

A61K31/138 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P31/18 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, NPL, XPESP, XPESP2, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.12.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2,3	SI
	Reivindicaciones 1,4-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2,3	SI
	Reivindicaciones 1,4-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CLOUSER, C.L. et al. Biological & Medicinal Chemistry Letters 2012, Vol. 22, pp. 6642-6646	06.09.2012
D02	US 2011/0046147 A1 (HARTMANN, R. et al.)	24.02.2011
D03	STEVENSON, C.B. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013, Vol. 23, pp. 1703-1706.	04.02.2013
D04	TSYGANKOVA, I.G. & ZHENODAROVA, S.M. Russian Journal of General Chemistry 2011, Vol. 81, Nº 5, pp. 913-919	2011
D05	ORTEGA, A. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011, Vol. 21, pp. 2183-2187	13.03.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un **compuesto** de fórmula general (I), el **uso** del compuesto (I) para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones causadas por virus ARN, una **composición farmacéutica** que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y un **método de obtención** de los compuestos de fórmula (I) mediante acoplamiento de Suzuki.

El documento D01 divulga una serie de derivados de resveratrol con actividad antiviral, en concreto anti HIV-1, que se engloban en la fórmula general (I) de la invención (ver página 6642, resumen). En concreto, se divulgan el compuesto **6** derivado de terfenilo (A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, en el que R⁵, R⁶ y R⁷ son hidroxilo y R¹, R², R³, R⁴ y R⁸ son H), el compuesto **7** (A y B son fenilo, C es piridina, R¹=R²=OH y R³=R⁴=R⁵=R⁶=R⁷=R⁸=H en la fórmula (I) de la invención), el compuesto **12a** (A y C son fenilo, B es pirimidina, R¹=R²=R⁸=OH y R³=R⁴=R⁵=R⁶=R⁷=H en la fórmula (I) de la invención) y el compuesto **12b** (A y C son fenilo, B es pirimidina, R⁵=R⁶=R⁷=OH y R¹=R²=R³=R⁴=R⁸=H en la fórmula (I) de la invención) (ver página 6643, figura 1). Estos compuestos se obtienen mediante reacciones secuenciales de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura a partir de los derivados apropiados de ácido borónico y los correspondientes haluros de arilo (ver página 6644, columna 1, párrafo 1; esquema 2). Estos compuestos mostraron actividad anti HIV-1 en los ensayos de replicación utilizando genes marcadores para determinar la frecuencia de mutaciones, tanto solos como en combinación con decitabina, actuando sinérgicamente para inhibir la infección (ver página 6644, columna 1, párrafo 2; página 6645, columna 2, párrafo 3; tablas 1 y 2).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 4-14** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

El documento D02 divulga una serie de inhibidores de 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1, algunos de los cuales presentan estructura de para-triterfenilo y se engloban en la fórmula general (I) de la invención (párrafo [0001]). En concreto, se divulgan el 3,3'-dimetoxi-[1,1';4', 1'']terfenilo (ejemplo **107**: A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, R¹ y R⁶ son metoxilo y R², R³, R⁴, R⁵, R⁷ y R⁸ son H) (ver párrafo [0301]); el 4,3'-dimetoxi-[1,1';4', 1'']terfenilo (ejemplo **109**: A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, R⁶ y R⁷ son metoxilo y R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁸ son H) (ver párrafo [0305]); el [1,1';4',1'']terfenil-3,3'-diol **42** (ejemplo **111**: A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, R¹ y R⁶ son hidroxilo y R², R³, R⁴, R⁵, R⁷ y R⁸ son H) (ver párrafo [0309]), el [1,1';4',1'']terfenil-4,3'-diol **44** (ejemplo **113**: A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, siendo en el que R⁶ y R⁷ hidroxilo y R¹=R²=R³=R⁴=R⁵=R⁸=H) (ver párrafo [0313]). Además, también se divulgan el 3,3'-piridina-2,5-diildifenol (**57**) (ejemplo **127**: A y C son fenilo, B es piridina en la fórmula (I) de la invención, R¹ y R⁵ son hidroxilo y R²=R³=R⁴=R⁶=R⁷=R⁸=H) (ver párrafo [0339]) y el 3,3'-pirazina-2,5-diildifenol (**58**) (ejemplo **127**: A y C son fenilo, B es pirazina en la fórmula (I) de la invención, R¹ y R⁵ son hidroxilo y R²=R³=R⁴=R⁶=R⁷=R⁸=H) (ver párrafo [0341]). El documento D02 divulga igualmente el procedimiento de obtención de los compuestos mencionados, por medio de reacciones secuenciales de acoplamiento cruzado de Suzuki entre los derivados de ácido borónico apropiados y los correspondientes haluros de arilo (ver reivindicación 14; párrafos [0302], [0306], [0310], [0314], [0340], [0342]), así como una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos (ver reivindicación 10).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 4, 5, 10-14** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D02 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

El documento D03 divulga tres compuestos isoméricos con estructura de 3,3'',4,4''-tetrahidroxiterfenilo que presentan actividad *in vitro* contra la agregación del péptido β -amiloide que se produce en la enfermedad de Alzheimer (ver página 1703, resumen). Así, el documento divulga el compuesto **3a**, que se incluye en la fórmula general (I) de la invención (A, B y C son fenilo; R¹, R⁶, R⁷ y R⁸ son hidroxilo; R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno) y su precursor **2a** (A, B y C son fenilo; R¹, R⁶, R⁷ y R⁸ son metoxilo; R², R³, R⁴ y R⁵ son hidrógeno), que se obtiene mediante una reacción de Suzuki-Miyaura entre ácido 3,4-dimetoxifenilborónico y 1,4-dibromobenceno (ver página 1704, esquema 1).

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 4, 5, 10-14** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D03 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

El documento D04 divulga una serie de compuestos derivados de estilbeno con actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis (ver página 913, resumen), entre los que se encuentran los compuestos **32-34**, que se incluyen dentro de la fórmula general (I) de la invención, siendo en todos los casos A, B y C grupos fenilos, y los diferentes sustituyentes H, OH ó MeO) (ver página 915, tabla 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 4, 5, 10-13** no es nuevo según lo divulgado en el documento D04 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

El documento D05 divulga una serie de compuestos derivados de arilquinona con capacidad para interactuar con el mecanismo amiloidogénico del procesamiento de la proteína precursora del β -amiloide (ver página 2183, resumen). Entre estos compuestos se halla el derivado **5**, que está incluido dentro de la fórmula general (I) de la invención (A, B y C son fenilo en la fórmula (I) de la invención, siendo R³=R⁴=OH, y R¹=R²=R⁵=R⁶=R⁷=R⁸=H) (ver página 2184, figura 1).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 4, 5, 10-13** no es nuevo a la luz de lo divulgado en el documento D05 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación o sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones dependientes **2**, que se refiere a los compuestos de fórmula (I) que poseen determinados sustituyentes, como son grupos aminoalquilo en posiciones 1,3- de los anillos A y C; y **3**, relativa a una serie de compuestos concretos.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **2 y 3** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos por los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.