

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 672 218**

51) Int. Cl.:

C07C 213/02 (2006.01)
C07C 217/60 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/14 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/EP2014/053294**
 87) Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128198**
 96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14705358 (1)**
 97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2958887**

54) Título: **Compuestos tricíclicos sustituidos bilateralmente para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y otras enfermedades**

30) Prioridad:

21.02.2013 ES 201330235

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2018

73) Titular/es:

CENTRO INVESTIGACION PRÍNCIPE FELIPE (25.0%)
Carrer D'Eduardo Primo Yufera, 3
46012 Valencia, ES;
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (25.0%);
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA "SAN VICENTE MÁRTIR" (25.0%) y
UNIVERSITAT DE VALENCIA (25.0%)

72) Inventor/es:

GALLEGO SALA, JOSÉ;
FUSTERO LARDIÉS, SANTOS;
ALCAMÍ PERTEJO, JOSÉ;
GONZÁLEZ BULNES, LUIS;
IBÁÑEZ SÁNCHEZ, IGNACIO;
CATALÁN MUÑOZ, SILVIA;
PRADO MARTÍN, SILVIA;
CANTERO CAMACHO, ÁNGEL y
BARRIO FERNÁNDEZ, PABLO

74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 672 218 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos tricíclicos sustituidos bilateralmente para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y otras enfermedades

5

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos compuestos tricíclicos sustituidos bilateralmente y composiciones farmacéuticas que los contienen para su uso como medicamentos.

10

Debido a su capacidad de interactuar con un bucle interno de ARN y de mimetizar una α -hélice proteica, estos compuestos son eficaces en el tratamiento y/o la prevención de la infección por el VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1) y otras enfermedades, tales como las provocadas por otros virus ARN y por bacterias grampositivas y gramnegativas, o enfermedades infecciosas o crónicas que responden a la inhibición de la transcripción a ADN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos pueden usarse para modular la función de bucles internos del ARN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos pueden usarse como agonistas o inhibidores de proteínas de α -hélice en interacción con otras biomoléculas.

15

Antecedentes de la invención

20

De acuerdo con el informe de 2011 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las infecciones por VIH afectaron a 34 millones de personas en todo el mundo en 2010, provocando 2,7 millones de nuevos casos y 1,8 millones de muertes.

25

En los últimos años la terapia antirretrovírica ha dado como resultado la disminución de las tasas de incidencia y mortalidad del SIDA. El tratamiento actual de la infección por VIH-1 se basa en combinaciones de tres o cuatro fármacos que inhiben la proteasa, la transcriptasa reversa o la integrasa del virus, o que bloquean su entrada en la célula. Sin embargo, estos tratamientos no eliminan la infección (1, 2). La aparición de resistencias y la falta de una vacuna eficaz refuerzan aún más la necesidad de identificar nuevos fármacos que actúen sobre dianas alternativas del virus. Por tanto, existe en la actualidad una necesidad urgente de nuevos tratamientos eficaces para eliminar la infección provocada por el VIH-1.

30

El ARN desempeña un papel central en el funcionamiento de los organismos vivos (3), y muchas moléculas de ARN humanas, bacterianas y víricas poseen un potencial terapéutico considerable. Actualmente se usan dos estrategias para abordar estas moléculas. El primer enfoque se basa en la generación de moléculas antisentido o de ARNi, dirigidos a aparear bases 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 e interferir con su función (4, 5).

35

40

Los motivos de ARN funcionales y estructurados no son fácilmente accesibles a los agentes antisentido y tienen la ventaja de una alta conservación de secuencia y/o estructura tridimensional. En el campo de los antiinfecciosos esto es importante, ya que podría resultar en una aparición más lenta de resistencias a los fármacos que actúen sobre ellos. Numerosos productos naturales con actividad antibiótica ejercen su acción mediante la unión a sitios dentro del ARN ribosómico bacteriano. Sin embargo, el desarrollo de nuevos agentes antiinfecciosos de unión a ARN se ha visto obstaculizado por las dificultades impuestas por estas estructuras, que poseen una diversidad fisicoquímica limitada y son con frecuencia flexibles (4-6). Para que esta estrategia tenga éxito, es esencial identificar nuevos armazones químicos, así como nuevos mecanismos de reconocimiento específico de estructura de ARN.

45

50

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 de tipo 1 (VIH-1). Dentro del subdominio IIB del RRE, el surco mayor inusualmente ensanchado de un bucle interno GGCG:ACGGUA grande forma un complejo de alta afinidad (7) con la α -hélice rica en arginina de Rev (Figura 1a), una proteína de 116 aminoácidos codificada por virus que adopta una conformación hélice-vuelta-hélice (8, 9). Esta interacción inicial entre el bucle interno IIB del RRE 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 desencadena una cascada de eventos que permiten el transporte de moléculas no cortadas y empalmadas o cortadas y empalmadas de forma incompleta de ARN viral al citoplasma de la célula infectada en la fase tardía del ciclo vírico. Estos eventos incluyen la incorporación de moléculas adicionales de Rev al complejo (10) y la asociación de la ribonucleoproteína RRE-Rev al factor de exportación del hospedador Crm1.

55

60

Las pruebas acumuladas en los últimos años indican que Rev tiene efectos pleiotrópicos (11) además de la exportación nuclear de ARN, esta proteína ha demostrado potenciar la traducción y el empaquetamiento (11 12) y controlar el lanzamiento nucleocitoplasmático de la integrasa del VIH-1 (13). Claramente, Rev representa una importante diana para la terapia anti-VIH-1. Sin embargo, hasta ahora el diseño racional de inhibidores a base de Rev ha seguido siendo un objetivo difícil de alcanzar y ninguno de los inhibidores a base de Rev o RRE evaluados hasta ahora han entrado en uso clínico (14).

65

El documento WO 02/089738 A2 desvela compuestos útiles para la inhibición de la interacción de una proteína alfa helicoidal o sitio de unión, incluyendo compuestos de terfenilo en los que cuando al menos uno de R^1/R^2 y al menos uno de R^5/R^6 , de acuerdo con la fórmula (I) de la presente invención, son hidrógeno.

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de fórmula general I y sus sales, ésteres y solvatos farmacéuticamente aceptables, y a su uso como medicamentos, en particular para la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH-1 y otras enfermedades. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades provocadas por otros virus ARN y por bacterias grampositivas y gramnegativas, así como enfermedades infecciosas o crónicas que responden a la inhibición de la transcripción a ADN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos pueden usarse para modular la función de bucles internos del ARN, o como agonistas o inhibidores de proteínas de α -hélice en la interacción con otras biomoléculas.

En otro aspecto la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención y a su uso como medicamentos.

La presente invención se basa en el diseño informático, la síntesis orgánica y la evaluación biológica de compuestos tricíclicos unidos 1,4 sustituidos bilateralmente de fórmula I. La introducción de sustituyentes en orto a ambos lados de un armazón tricíclico garantiza una proyección de cadena lateral de 360° similar a la observada en el complejo IIB-Rev₃₄₋₅₀ de RRE de alta afinidad, donde dos terceras partes de la α -hélice están rodeadas de ARN. Esta conformación, junto con su composición química, permite que los compuestos interactúen de manera específica con el bucle interno de RRE IIB del ARN del VIH-1. Los experimentos confirmaron que los compuestos de la invención se unieron al bucle interno IIB del RRE mediante el mimetismo de la α -hélice de unión a ARN de la proteína Rev del VIH-1 y fueron capaces de inhibir la interacción RRE-Rev tanto in vitro como ex vivo. Además, los inhibidores más potentes bloquearon la replicación del VIH-1 ex vivo y ejercieron este efecto en etapas posteriores a la integración del ciclo de vida del virus, como se esperaba. Además de su acción sobre el sistema RRE-Rev, un ensayo celular demostró que los p-terfenilos sustituidos bilateralmente inhibieron la transcripción mediada por el promotor LTR de VIH-1. No se detectó toxicidad celular en ensayos ex vivo.

Los compuestos de la invención actúan sobre el sistema RRE-Rev vírico, una diana terapéutica que es esencial para la replicación del VIH-1 y no se ha explotado todavía. Tienen un armazón novedoso, no peptídico, sintético, capaz de reconocer un motivo de ARN vírico fuertemente conservado. Esto puede dar como resultado un aspecto más lento de la resistencia relativa a los compuestos utilizados actualmente en la clínica, que actúan sobre dianas proteicas menos conservadas del virus. Además, puesto que tanto RRE como Rev son codificados por el virus y no hay implicado ningún factor celular en la interacción RRE-Rev, los inhibidores de RRE-Rev de la invención pueden bloquear la replicación del VIH-1 con efectos menores sobre componentes celulares y, por tanto, menos toxicidad.

Además, los experimentos basados en susceptibilidades de disco indicaron que los compuestos de la invención tenían actividad antibiótica contra bacterias grampositivas y gramnegativas.

Los compuestos de la presente invención se representan por la Fórmula I como se define en la reivindicación 1.

Descripción de las figuras

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, Rev₃₄₋₅₀ (7) y (b) una representación esquemática de una molécula de p-terfenilo sustituido bilateralmente superpuesta sobre una α -hélice.

La Figura 2 representa un análisis de SPR (resonancia de plasmón superficial) 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 sensogramas SPR (izquierda) y curvas de unión en estado estacionario (derecha) representativos para interacciones RRE:IIS-478 (arriba), RRE_c:IIS-478 (en medio) y TAR_c:IIS-478 (abajo), medidas a 25 °C y pH 7.4. Las concentraciones de ligando representadas abarcaron un intervalo entre 0,1 y 100 μ M. Se fijaron cantidades similares de ARN de horquilla (aproximadamente 300 RU) en los canales del *chip* SPR. Los parámetros de unión y los valores χ^2 obtenidos del ajuste de las curvas se indican en los gráficos.

La Figura 3 representa espectros de RMN de complejos representativos de la horquilla de ARN RRE con moléculas de bifenilo y terfenilo. Se muestran las asignaciones de las regiones aromáticas TOCSY H5-H6 (tiempo de mezcla de 60 ms, 27 °C) de las interacciones RRE:IIS-420, RRE:IIS-806 y RRE:JB-398. Los picos cruzados H5-H6 de pirimidina de RRE están marcados con el nombre y número de residuo. En todos los casos, el espectro de RRE libre (1:0) está superpuesto sobre los espectros de complejos con relaciones molares de RRE:ligando crecientes.

La Figura 4 representa un modelo informático basado en RMN de un complejo RRE:IIS-311, construido a partir de la estructura tridimensional de RRE (PDB 1ETF) (7).

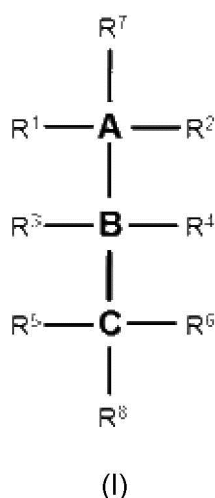
La Figura 5 representa la inhibición de la interacción RRE-Rev₃₄₋₅₀ por los terfenilos IIS-420 e IIS-375 y el antibiótico de referencia neomicina B, medida in vitro usando un ensayo de desplazamiento basado en polarización de fluorescencia. En los gráficos, la anisotropía normalizada se representa frente al logaritmo de la concentración de compuesto (μM) y se indican los valores de R^2 de los ajustes utilizados para obtener los datos de CI_{50} .

5 Las Figuras 6a - d representan resultados de ensayos celulares. (a) Actividad antivírica en ensayos de infección por VIH-1 (NL4.3-Ren) y toxicidad celular (viabilidad) de compuestos de terfenilo y bifenilo y el antibiótico de referencia neomicina B. (b) Actividad antivírica en ensayos de transfección de VIH-1 de moléculas de terfenilo. (c) Inhibición del transporte mediado por Rev de ARN que contiene RRE al citoplasma por el terfenilo IIS-420. (d) Inhibición de la transcripción mediada por LTR de VIH-1 por los terfenilos IIS-420, IIS-358 y IIS-758. En todos los casos, los resultados se expresan como porcentaje de RLU, donde el 100 % son los niveles de luminiscencia obtenidos con el vehículo utilizado para disolver los compuestos.

Descripción detallada de la invención

15

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto representado por la Fórmula I:



20 como se define en la reivindicación 1, en la que:

A, B y C son benceno,

R^1 y R^2 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno A y en meta en relación con el átomo de carbono de A unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo y aminopropilo opcionalmente sustituidos;

25 R^3 y R^4 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno B y en orto en relación con el átomo de carbono de B unido al benceno A; y se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilamida (C1-C6), éster de alquilo (C1-C6), hidroxialquilo (C1-C6), haloalquilo (C1-C6), alcoxialquilo (C1-C6), alquilo (C1-C8), con la condición de que al menos uno de R^3 y R^4 no sea hidrógeno;

30 R^5 y R^6 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno C y en orto en relación con el átomo de carbono de C unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo y aminopropilo opcionalmente sustituidos;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi (C1-C10), alquilamina (C1-C10), alquilguanidina (C1-C10), alquilamida (C1-C10), éster de alquilo (C1-C10), hidroxialquilo (C1-C10), alcoxialquilo (C1-C10), haloalquilo (C1-C10), alquilo (C1-C10), aril alcoxi y éster de arilo.

35 El término "alquilo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto hidrocarburo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Puede ser ramificado o lineal, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo o hexilo.

El término "halo" o "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

40 El término "alcoxi" se refiere a un resto alquilo como se define en el presente documento, unido a un átomo de oxígeno. Incluye, por ejemplo, metoxi o etoxi.

45 El término "arilo" se refiere a sistemas de anillos aromáticos que tienen de 5 a aproximadamente 50 átomos, con de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos o de aproximadamente 5 a 6 átomos en el que los átomos se pueden seleccionar independientemente entre C, N, O o S. El grupo arilo puede usarse solo o como parte de otro grupo. El grupo arilo puede tener un solo anillo o múltiples anillos, condensados o unidos por enlaces sencillos. Los

ejemplos incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, bifenilo, antrilo, indanilo, trifluorometilbencilo, piridilo, pirimidilo, bencimidazol, terfenilo, benzoxazol, benzotiazol, indazol, quinazolina, tiofenilo.

5 La expresión "opcionalmente sustituido" significa no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes que tienen uno o más grupos funcionales diferentes en una o más posiciones.

Los compuestos preferidos de la presente invención incluyen compuestos de fórmula (I) en los que R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilamida, éster de alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, haloalquilo y alquilo, con la condición de que al menos uno de R³ o R⁴ no sea hidrógeno.

10

También se prefieren compuestos de la invención que tengan R⁷ y R⁸ distintos de hidrógeno.

Se prefieren compuestos en los que todos los sustituyentes no sean hidrógeno.

15

A, B y C son benceno,

R¹ y R² están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro y en meta en relación con el átomo de carbono de A unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo o aminopropilo opcionalmente sustituidos,

20

R³ y R⁴ están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro y en orto en relación con el átomo de carbono de B unido al benceno A; y se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilamida (C1-C6), éster de alquilo (C1-C6), hidroxialquilo (C1-C6), haloalquilo (C1-C6), alcoxialquilo (C1-C6), alquilo (C1-C8), con la condición de que al menos uno de R³ y R⁴ no sea hidrógeno.

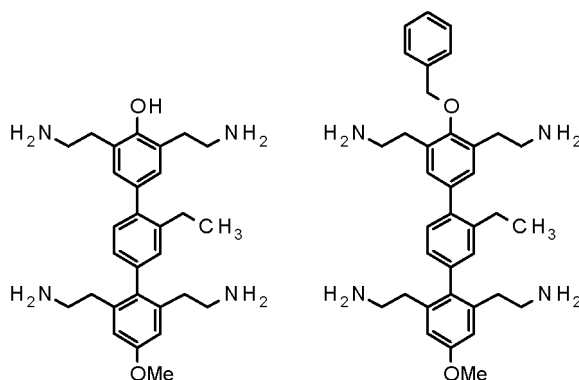
25

R⁵ y R⁶ están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno C y en orto en relación con el átomo de carbono de C unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo y aminopropilo opcionalmente sustituidos;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi (C1-C10), alquilamina (C1-C10), alquilguanidina (C1-C10), alquilamida (C1-C10), éster de alquilo (C1-C10), hidroxialquilo (C1-C10), alcoxialquilo (C1-C10), haloalquilo (C1-C10), alquilo (C1-C10), aril alcoxi y éster de arilo

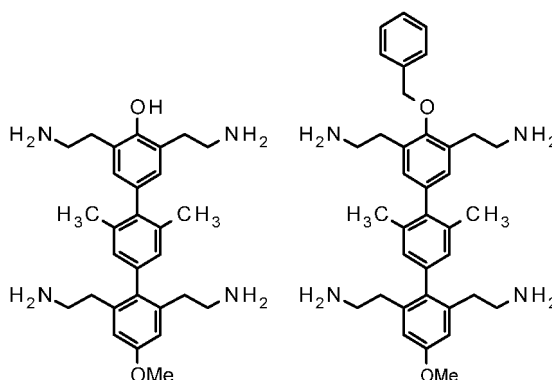
30

Ejemplos de compuestos representados por la fórmula general I son como se indica a continuación:



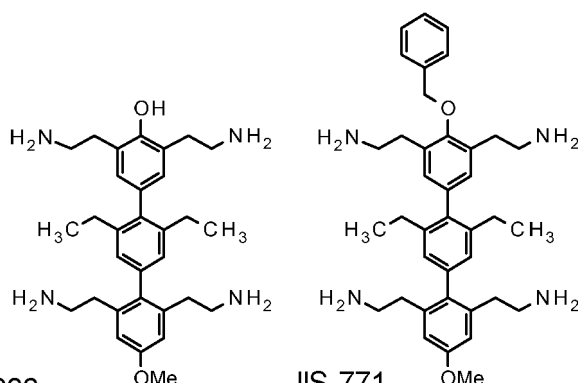
IIS-792

IIS-758



IIS-420

IIS-375



IIS-806

IIS-771

Los compuestos particularmente preferidos incluyen:

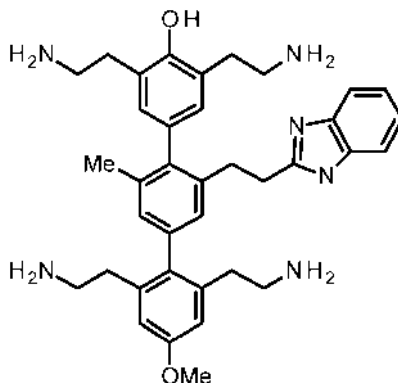
- | | | |
|----|----------|---|
| 5 | IIS-530: | 2,2',2'',2'''-(4''-(ciclohexilmetoxi)-3',4'-dimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5',6-tetraetil)tetraetilamina |
| | IIS-420: | 2'',3,5,6'''-tetraquis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol |
| | IIS-375: | 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-4'-metoxi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5',6-tetraetil)tetraetilamina |
| | IIS-792: | 2'',3,5,6'''-tetraquis(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 |
| 10 | IIS-806: | 2'',3,5,6'''-tetraquis(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 |

Los compuestos más preferidos incluyen:

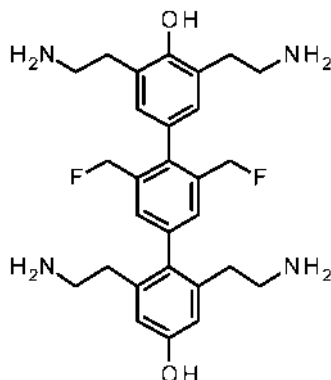
- IIS-806: 2",3,5,6"-tetraquis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4"-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 IIS-711: 2,2',2'',2'''-(4''-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraol)tetraetilamina
 5 IIS-420: 2",3,5,6"-tetraquis(2-aminoetil)-4"-metoxi-2',6'-dimetil-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol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

Son ejemplos adicionales de compuestos de fórmula (I):

- 10 2'-(2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)-2'',3,5,6"-tetraquis(2-aminoetil)-4"-metoxi-6'-metil-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol



2,3'',5'',6-tetraquis(2-aminoetil)-3',5'-bis(fluorometil)-[1,1':4',1"-terfenil]-4,4"-diol



15

En un aspecto adicional de la presente invención, un compuesto de Fórmula (I) es útil para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano.

- 20 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I); y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano.

25 Se desvela el uso de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para la unión específica al bucle interno IIB del RRE del ARN del virus VIH-1.

Se desvela el uso de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para inhibir la interacción entre RRE y la proteína del VIH-1 Rev.

30 Se desvela el uso de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para inhibir la transcripción mediada por el promotor LTR del VIH-1.

Se desvela el uso de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para bloquear la replicación del VIH-1 *in vivo*.

35

Se desvela el uso de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para inhibir bacterias grampositivas y gramnegativas y prevenir y/o tratar infecciones bacterianas.

Puede usarse un compuesto de Fórmula (I) o composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para

prevenir y/o tratar infecciones por VIH-1 y enfermedades relacionadas incluyendo, pero no limitadas a, infecciones causadas por otros virus ARN tales como el VIH-2 y otros retrovirus, el virus del síndrome respiratorio agudo grave y otros coronavirus, el virus de la hepatitis C, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental y otros flavivirus, el poliovirus y otros picornavirus, el virus de la gripe y otras ortomixovirus, el virus del Ébola y otros filovirus, el virus paragripal humano y otros paramixovirus y el rotavirus y otros reovirus; enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos puedan usarse para modular la función de bucles internos de ARN tales como los presentes en la telomerasa o el ARNm de oncogenes humanos tales como l-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 o la prevención de infecciones causadas por bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis* o *Pseudomonas aeruginosa* entre otros) o en regiones funcionales de moléculas de ARN víricas tales como el dominio 3'X del virus de la hepatitis C (relevantes para el tratamiento de enfermedades causadas por éste y otros virus ARN); enfermedades infecciosas o crónicas sensibles a la inhibición de la transcripción del ADN, tales como inhibición de la transcripción impulsada por el LTR de VIH-1 (relevante para el tratamiento de infecciones por VIH), o la inhibición de la transcripción modulada por factores de transcripción humanos tales como NF- κ B, factores STAT o HMG-1, entre otros (relevantes para el tratamiento de una diversidad de cánceres humanos, incluyendo el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello, el mieloma múltiple y el cáncer de células renales); y enfermedades infecciosas o crónicas donde los compuestos de la invención puedan usarse como agonistas o inhibidores de proteínas de α -hélice en interacción con otras biomoléculas, tales como el factor de transcripción c-myc en interacción con ADN y proteínas como Max (relevantes para el tratamiento y/o la prevención de diversos tipos de cáncer tales como el linfoma de Burkitt y los cánceres de colon y próstata entre otros), factores Ap-1 y Sp-1 y receptores de esteroides en interacción con ADN (relevantes para el tratamiento del hepatocarcinoma entre otros tipos de cáncer) 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 (relevante para el tratamiento de infecciones por el VIH). Otras enfermedades en las que estos compuestos se pueden utilizar como agonistas o inhibidores de proteínas de α -hélice en interacción con otras biomoléculas también puede incluir, por ejemplo, infecciones por virus del herpes simple, hipertensión, psoriasis, asma, enfermedades autoinmunitarias incluyendo lupus (lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple y artritis reumatoide, fibromialgia, trastornos neuronales tales como epilepsia, y enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, entre otras.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar como agonistas o antagonistas en ensayos de unión, y como agentes analíticos, entre otros usos.

La síntesis de los compuestos de fórmula (I) representa otro aspecto de la invención. Los compuestos de la fórmula general (I) se pueden preparar por cualquier método adecuado conocido en la técnica y/o por los procesos descritos a continuación. Se apreciará que cuando se requiere un estereoisómero particular de fórmula (I), los procesos de síntesis que se describen en el presente documento se pueden usar con el material de partida homoquiral apropiado y/o los isómeros se pueden resolver a partir de mezclas utilizando técnicas de separación convencionales (por ejemplo, HPLC).

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante la formación de enlaces C-C secuenciales a través del acoplamiento de Suzuki catalizada por paladio de halogenuros, ariltriflatos y ésteres borónicos de los anillos A, B y C bilateralmente sustituidos. En este método, R¹, R², R⁵ y R⁶ de la molécula final de fórmula (I) son introducidos por los derivados de haluro de A y C y R³ y R⁴ se introducen por el éster borónico de B.

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.

Se apreciará que los compuestos de acuerdo con la invención pueden contener átomos de carbono asimétricamente sustituidos. La presencia de uno o más centros asimétricos en un compuesto de fórmula I puede dar lugar a estereoisómeros y, en cada caso, se ha de entender que la invención se extiende a todos estos estereoisómeros, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, y mezclas, incluyendo mezclas racémicas y no racémicas de los mismos, que pueden obtenerse mediante métodos conocidos 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 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), con la condición de que sean sales farmacéuticamente aceptables, pueden usarse en la presente invención. Dichas sales y solvatos correspondientes también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Es posible una diversidad de vías de administración de los compuestos y las composiciones de la presente

- invencción 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 microvehículos de liberación lenta, dependiendo de la afección que va a tratarse. La administración oral, parenteral e intravenosa son modos de administración preferidos. La formulación de los compuestos de la presente invencción que va a administrarse variará de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, disolución, emulsión, gel, aerosol, cápsula). Formas farmacéuticas adicionales de acuerdo con la presente invencción son, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, pomadas, cremas, pastas, geles, tinturas, barras de labios, gotas, jarabes, aerosoles y pulverizaciones.
- Una composición apropiada de la presente invencción que comprende el compuesto o los compuestos de Fórmula (I) puede prepararse en un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable y adyuvantes y conservantes opcionales. Para disoluciones o emulsiones, los vehículos 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 vehículos 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 no volátiles. 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 invencción, preferentemente en forma de suspensiones, emulsiones, dispersiones o disoluciones acuosas isotónicas. Estas composiciones son preferentemente 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 realiza habitualmente en condiciones estériles, al igual que el llenado, por ejemplo, en ampollas o viales y el sellado de los recipientes. 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 de acuerdo con la presente invencción pueden comprender excipientes, por ejemplo, vehículos, estabilizadores (agentes reductores, antioxidantes y/o agentes secuestrantes), agentes tamponantes, 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) de acuerdo con la presente invencción 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.
- Si se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el compuesto de la presente invencción 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 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 suspensión tales como polivinilpirrolidona, así como con edulcorantes o correctores del sabor.
- La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente invencción incluye cualquier disolvente, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean compatibles con la actividad de los compuestos y sean fisiológicamente aceptables para el sujeto.
- "Cantidad eficaz" como se usa en la presente invencción incluye la cantidad del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, éster, isómero, solvato o profármaco del mismo que permite que realice su función prevista, es decir, tratamiento de infecciones por VIH-1 y otras enfermedades. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades causadas por otros virus ARN y por bacterias grampositivas y gramnegativas, enfermedades infecciosas o crónicas sensibles a la inhibición de la transcripción del ADN 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 biomoléculas.
- Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la sustancia activa de la presente invencción 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 de la afección 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 (medida como la forma sólida) de aproximadamente 0,05 mg a 100 mg/kg de peso corporal. Una dosis preferida aproximada oscila entre 0,1 -50 mg/kg/día, más preferentemente entre aproximadamente 1-20 mg/kg/día.

10 El compuesto puede administrarse en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto una vez al día o en diferentes momentos en el día, de manera profiláctica o terapéutica, preferentemente en una cantidad eficaz contra la infección por VIH-1 o la enfermedad relacionada, a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que requiere dicho 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 aproximadamente 7,5 g,
15 preferentemente desde aproximadamente 0,07 g hasta aproximadamente 0,150 g, de un compuesto de Fórmula I o una sal, éster, isómero, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender desde el 0,01 % al 100 % en peso de una mezcla de un compuesto de Fórmula I, normalmente desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 80 %.

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

25 Normalmente, las formas de administración de dosis unitaria de acuerdo con la presente invención pueden comprender desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 80 % del compuesto de Fórmula I.

30 Las formas de dosis unitaria de acuerdo con 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.

35 La presente invención se refiere especialmente al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal, éster, isómero y/o solvato farmacéuticamente aceptable, tal cual o en forma de una formulación farmacéutica con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento terapéutico y también profiláctico de infecciones por VIH-1 y otras enfermedades. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades provocadas por otros virus ARN y por bacterias grampositivas y gramnegativas, enfermedades infecciosas o crónicas que responden a la inhibición de la transcripción a ADN, o enfermedades infecciosas o crónicas donde estos compuestos pueden usarse para modular la función de bucles internos del ARN, o como agonistas o inhibidores de proteínas de α -hélice en la interacción con otras biomoléculas.

40

Obtención de los compuestos de la invención

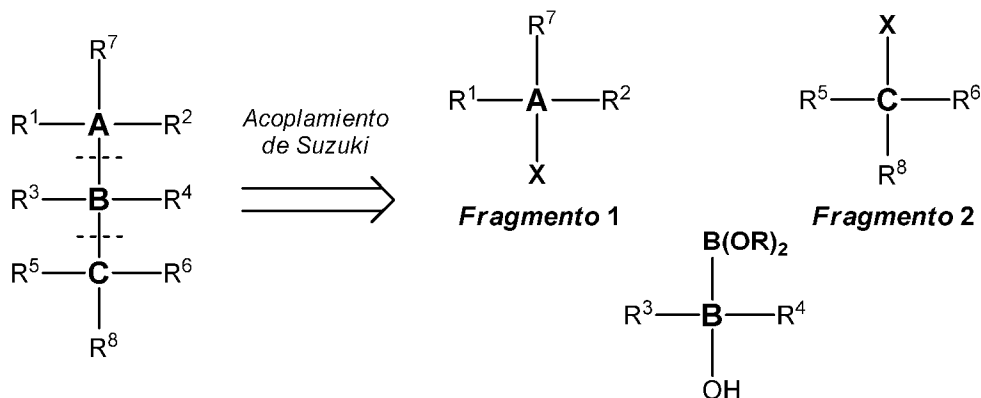
1.-Diseño basado en la estructura de inhibidores RRE-Rev.

45 Tomando como base la estructura tridimensional de Rev₃₄₋₅₀ unido al bucle interno IIB del RRE (7) (Figura 1a), los inventores se propusieron diseñar ligandos orgánicos que mimetizaran la distribución tridimensional de las cadenas laterales de la hélice de Rev₃₄₋₅₀ en su complejo con el ARN. A este respecto, algunos informes 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
50 laterales de α -hélice, y que algunos de estas moléculas eran capaces de inhibir interacciones proteína-proteína (15). Para el propósito de la presente invención, los inventores pensaron que la introducción de sustituyentes a *ambos* lados de un armazón p-terfenílico garantizaría una proyección de cadenas laterales 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 informático de una molécula p-terfenílica hexaquis-orto-sustituida con grupos bilaterales modelo confirmó esta
55 predicción: mientras que la orientación *orto* de los sustituyentes indujo una conformación escalonada, la presencia de sustituyentes a ambos lados de los anillos garantizó una amplia proyección de cadenas laterales en el espacio. Cálculos de "docking" posteriores apoyaron la hipótesis de que estas moléculas podrían unirse al bucle RRE mimetizando la α -hélice Rev₃₄₋₅₀. En estos cálculos se encajaron diversas moléculas p-terfenílicas hexaquis-sustituidas, así como distintos isómeros posicionales de moléculas tetraquis p-bifenílicas y tris p-terfenílicas, en la
60 estructura RRE (7) (códigos PDB 1ETF and 1ETG). Como se esperaba, los mejores resultados se obtuvieron para los ligandos p-terfenílicos hexaquis-orto-sustituidos con grupos bilaterales (definidos por la Fórmula 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
65 sintéticamente accesibles y podrían dar lugar a interacciones apropiadas con el armazón azúcar-fosfato del bucle interno del RRE.

2.-Síntesis de p-bifenilos y p-terfenilos bilateralmente sustituidos.

Tomando como base las predicciones computacionales, los inventores sintetizaron moléculas p-bifenílicas y p-terfenílicas con sustituciones bilaterales en los anillos de benceno, que corresponden a compuestos de Fórmula I. Las síntesis se basaron en acoplamientos de Suzuki secuenciales, catalizados por paladio (16-18), haluros de arilo y esteres aril borónicos, como se muestra en el siguiente esquema:

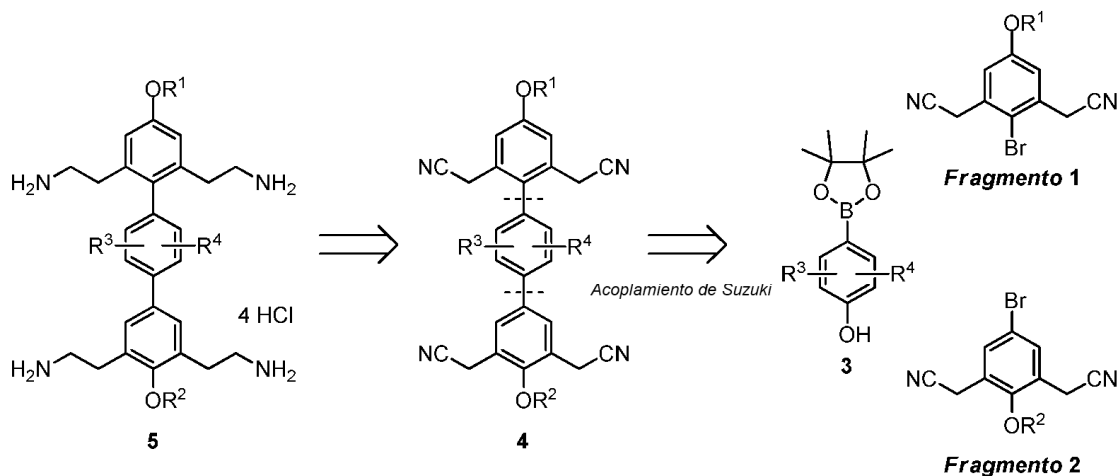
5



Esquema 1a

Se prepararon compuestos preferidos de la invención de acuerdo con el siguiente esquema:

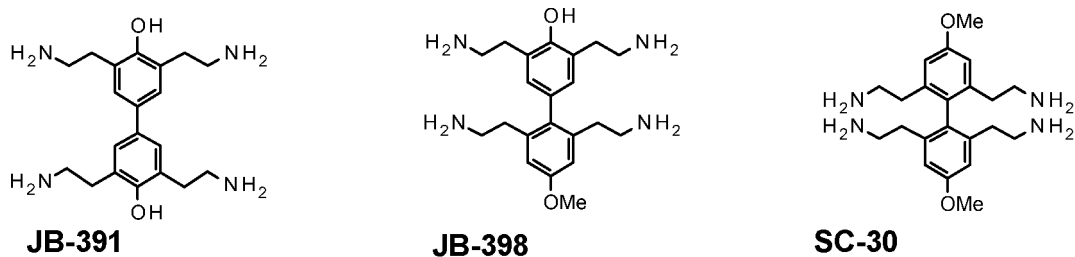
10



Esquema 1b

En primer lugar se sintetizó el siguiente grupo de tetraquis (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):

15

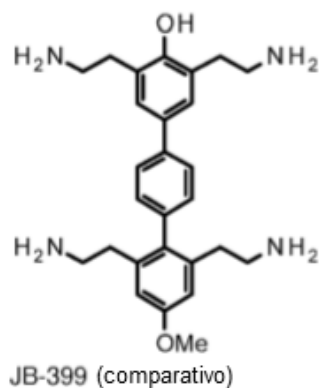


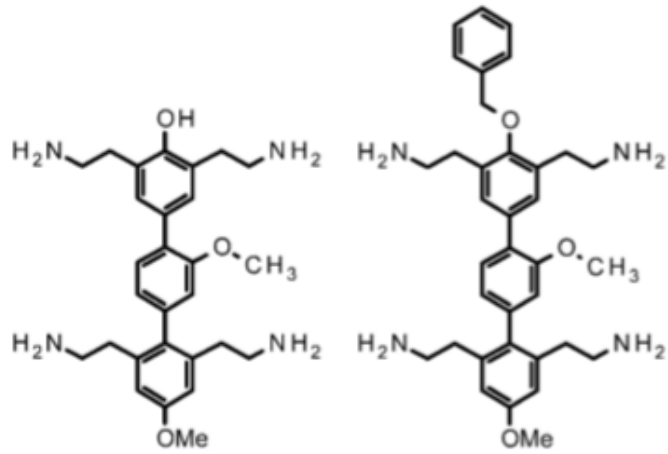
JB-391: 3,3',5,5'-tetraquis(2-aminoetil)-[1,1'-bifenil]-4,4'-diol
 JB-398: 2',3,5,6'-tetraquis(2-aminoetil)-4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

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

5 Las cadenas 2-aminoetilicas 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 -hélice (15). El impedimento estérico está maximizado en SC-30, donde las cuatro cadenas 2-aminoetilicas ocupan posiciones en *orto* respecto a los carbonos que enlazan los dos anillos de benceno. Por el contrario, las cadenas bilaterales 2-aminoetilicas de JB-391 están en *meta*, permitiendo a esta molécula adoptar una conformación plana.

10 Las siguientes moléculas terfenílicas se sintetizaron siguiendo el método descrito anteriormente:



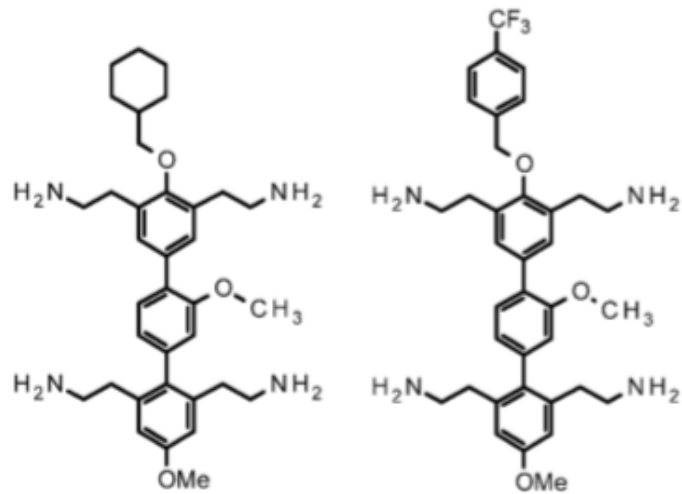


IIS-358

(comparativo)

IIS-311

(comparativo)

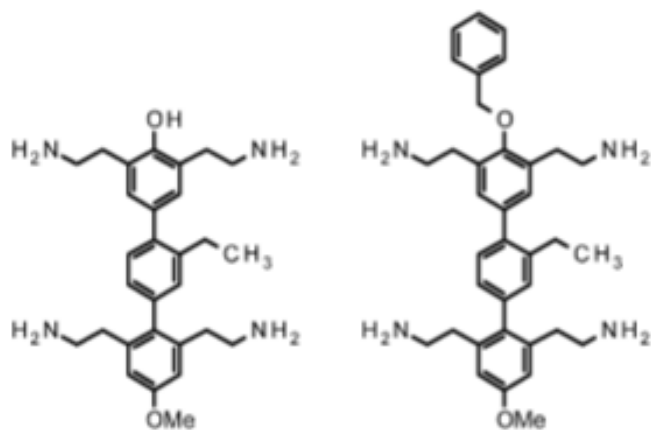


IIS-530

(comparativo)

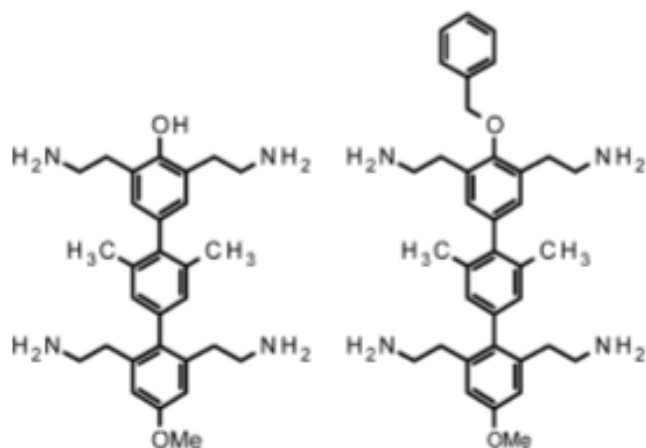
IIS-478

(comparativo)



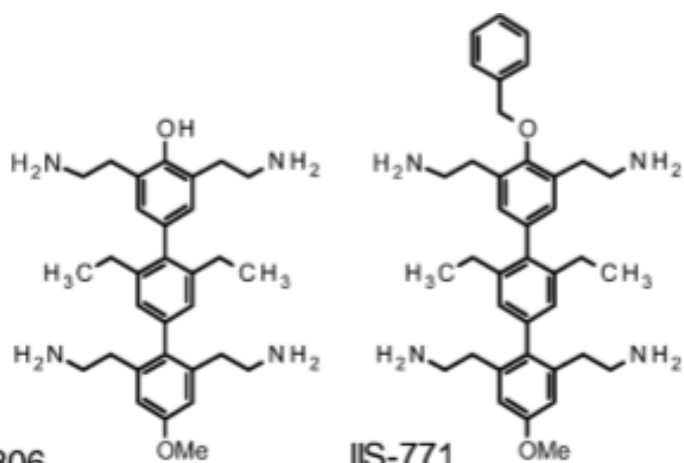
IIS-792

IIS-758



IIS-420

IIS-375



IIS-806

IIS-771

- 5 JB-399: 2'',3,5,6''-tetraquis(2-aminoetil)-4''-metoksi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
 IIS-358: 2'',3,5,6''-tetraquis(2-aminoetil)-2'',4''-dimetoksi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
 IIS-311: 2,2',2''-(4''-(benciloxi)-3',4'-dimetoksi-1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetraetilamina
 IIS-478: 2,2',2''-(3',4'-dimetoksi-4''-(4-(trifluorometil)benciloxi)-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetilamina
 IIS-530: 2,2',2''-(4''-(ciclohexilmetoksi)-3',4'-dimetoksi-1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetraetilamina
 10 IIS-420: 2'',3,5,6''-tetraquis(2-aminoetil)-4''-metoksi-2'',6''-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-4-ol
 IIS-375: 2,2',2''-(4''-(benciloxi)-4-metoksi-3',5'-dimetil-[1,1':4',1''-terfenil]-2,3'',5'',6-tetraetilamina

IIS-792:	2",3,5,6"-tetraquis(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-tetrail}tetraetilamina
IIS-806:	2",3,5,6"-tetraquis(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

5

La primera molécula de terfenilo (JB-399) contenía 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" tetraquis (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" tetraquis (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 e IIS-771) en el primer anillo. Estas moléculas son 3,5,2',2",6",6" hexaquis 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.

10

15

20 Funcionalidad de los compuestos

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

25

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) (19). Además de RRE, se inmovilizaron otras dos horquillas de ARN control en los chips: 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-1 (20). 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, 5, 14).

35

40

45

50

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 RRE (21). 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 $4,2 \pm 3,4$ 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 IIB (7). 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 (22, 23). 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 $2,2 \pm 1,4$ 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 RRE (23). 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 anteriores (24).

55

60

Cuando los ligandos bifenílicos y terfenílicos se evaluaron mediante estos experimentos, los mejores resultados se obtuvieron para las moléculas tetraquis (2-aminoetilo) terfenílicas, algunas de las cuales fueron capaces de unirse a la horquilla RRE con afinidades de 8 μ M y estequiometrías de unión que oscilaron entre una y dos moléculas para el sitio de mayor afinidad (Figura 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 Figura 2), comparables a las obtenidas con el péptido revp (14,5 y 4,4). Los compuestos terfenílicos conteniendo grupos hidrofóbicos (metilo y etilo) en el anillo central mostraron más afinidad por la horquilla RRE.

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.

65

Compuesto ^a	K _d (RRE) (M10 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

*: ejemplos comparativos

^aTodas las 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 realizaron a pH 6,25 excepto donde se indica.

5 ^bValores determinados usando un intervalo de concentraciones de ligando de 0,1-25 μM.

^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 μM, 2,1² ± 0,4 moléculas y 10,2, respectivamente.

^dValores determinados a pH 7,4, usando un intervalo de concentraciones de ligando de 0,1-25 μM.

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

15 La interacción entre la horquilla de RRE (SEQ. ID. No 1) y los compuestos bifenílicos y terfenílicos también se analizó usando RMN bidimensional (Figura 3). Estos experimentos fueron útiles para examinar la fortaleza de las interacciones y la localización de los sitios de unión y revelaron diferencias significativas entre los distintos compuestos. El bifenilo JB-391 requirió una relación molar RRE:ligando elevada (1:6) para producir cambios detectables en el espectro TOCSY de RRE (Figura 3, abajo), mientras que JB-391, SC-30 y neomicina B indujeron perturbaciones del desplazamiento químico en nucleótidos del tallo fuera del bucle interno. Éstas son indicaciones de unión débil e inespecífica, respectivamente.

20 Por el contrario, las moléculas de terfenilo indujeron únicamente cambios de desplazamiento químico en nucleótidos del bucle interno o inmediatamente adyacentes, particularmente C20, U23 y C25 (Figura 3). Las variaciones del desplazamiento resultaron ser más pronunciadas para los terfenilos conteniendo grupos hidrofóbicos (metilo y etilo) en el anillo de benceno central. JB-399 y los terfenilos IIS-358 e IIS-311, que contenían un grupo más polar (metoxi) en el anillo central, como IIS-358 e IIS-311, dieron lugar a variaciones similares, pero menos pronunciadas. Los terfenilos que dieron lugar a los mayores cambios de desplazamiento químico, así como a los picos de complejo más estrechos, fueron IIS-420 e IIS-806, que contenían dos grupos metilo y etilo, respectivamente, en las posiciones bilaterales 2' y 6' del benceno central (Figura 3, arriba y en medio). El bucle RRE pudo ser valorado con dos

equivalentes 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).

5 El hecho de que solo los nucleótidos situados en el bucle o posiciones adyacentes se ven afectados por la interacción indica claramente que los ligandos de terfenilo se unen selectivamente al bucle interno dentro de la horquilla de RRE (Figura 3). Además, se detectaron NOE intermoleculares débiles entre hidrógenos de terfenilo y protones de ARN situados en el surco mayor en los complejos IIS-420 y IIS-806. Estos contactos indican que la interacción con el bucle RRE tiene lugar desde el surco mayor, como es el caso con Rev₃₄₋₅₀ (7), confirmando que estos ligandos de terfenilos bilateralmente sustituidos ocupan el sitio de unión de Rev₃₄₋₅₀ en el ARN de RRE (Figura 10 4). El examen de los espectros NOESY de los mejores complejos también reveló que IIS-420 y IIS-806 inducen cambios conformacionales en la RRE similares a los provocados por Rev₃₄₋₅₀: esto se indicó por una disminución en la intensidad del NOE del intraresto H8-H1' de G22: esta guanina adopta una conformación *syn* en el bucle de RRE no unido que se vuelve *anti* tras la unión tanto de Rev₃₄₋₅₀ (25) como del ligando de terfenilo.

15 3.-Ligandos bifenílicos y terfenílicos inhiben la interacción RRE-Rev_{34,50} *in vitro*.

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 resultados se muestran en la Tabla 2 y Figura 5.

25 Este ensayo se validó midiendo los valores CI_{50} y K_i del péptido revp y el antibiótico de referencia neomicina B. La constante de inhibición K_i obtenida para revp ($4,1 \pm 0,8$ nM) concordó muy bien con la constante de disociación K_d determinada independientemente mediante SPR ($4,2 \pm 3,4$ nM). El valor K_i de la neomicina $2,0 \pm 0,2$ μ M (obtenido asumiendo que una molécula de ligando es responsable del desplazamiento de frevp observado) también coincidió con la K_d calculada por SPR ($2,4 \pm 1,1$ μ M) y con valores K_i previamente publicados en la literatura (23).

30 El terfenilo IIS-420, con un valor de CI_{50} de 6,8 μ M, fue el inhibidor más potente, seguido de JB-399 (comparativo) y otras moléculas de terfenilo que tienen grupos metilo o etilo en el benceno central (Figura 5 y Tabla 2). Las moléculas de terfenilo que contienen un único sustituyente en el benceno central, en particular los que pertenecen a la serie metoxi más polar, presentaron mayores CI_{50} . Las moléculas de bifenílo JB-391 y JB-398, con valores de CI_{50} de 7,7 y 22,1 μ M respectivamente, fueron sorprendentemente potentes en este ensayo. Sin embargo, estas moléculas interaccionan pobremente con el bucle RRE (e.g. Figura 3, abajo), por lo que es probable que ambas 35 inhiban la interacción RRE-frevp a través de un mecanismo diferente.

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias al 50 % de RRE-Rev₄₅₋₅₀ de moléculas bifenílicas y terfenílicas y neomicina B, medidas mediante experimentos de polarización de fluorescencia a 25 °C

compuesto	CI_{50}^a ($M \cdot 10^6$)
JB-391 *	7,7 \pm 0,8
JB-398 *	22,1 \pm 5,8
SC-30 *	308,7 \pm 68,9
JB-399 *	23,4 \pm 3,6
IIS-358 *	808,0 \pm 461,7
IIS-311 *	162,2 \pm 117,6
IIS-478 *	232,0 \pm 32,7

compuesto	CI_{50}^a ($M \cdot 10^6$)
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	6,8 ± 0,5
IIS-375	32,2 ± 2,3

*: ejemplos comparativos

^a Todos los valores de CI_{50} se obtuvieron con RRE 60 nM y frevp 10 nM. Los experimentos de PF se repitieron al menos dos veces y la tabla muestra la desviación típica de experimentos independientes excepto por IIS-311, IIS-358 y IIS-530, donde se indica el error típico del ajuste de una curva representativa. No se detectó ninguna inhibición de RRE-Rev₄₅₋₅₀ para los fragmentos de 2,6-(2-aminoetil)-4-metoxi-1-bromo-benceno y 2,6-(2-aminoetil)-4-benciloxi-1-bromo-benceno, utilizados como controles.

4. Los inhibidores de RRE-Rev₃₄₋₅₀ bloquean la replicación del VIH-1 *in vivo* y ejercen este efecto postranscripcionalmente.

Los terfenilos IIS-420, IIS-375, IIS-758, IIS-771, IIS-792 y IIS-806 inhibieron la replicación del VIH-1 sin citotoxicidad, como se muestra en la Tabla 3a y en la Figura 6.

Tabla 3. Resultados de ensayos celulares. (a) Actividad antivírica en los ensayos de infección por VIH-1 (CE_{50} , NL4.3-Ren) y toxicidad celular (CC_{50}). (b) Actividad antivírica en los ensayos de transfección por VIH-1 (CE_{50} , postintegración), (c) Inhibición del transporte mediado por Rev de ARN que contiene RRE al citoplasma por el terfenilo IIS-420. En todos los casos, se muestran intervalos de confianza y valores de R^2 cuando sea posible.

compuesto	Tabla 3a	
	CE_{50} (μM) (NL4,3-Ren)	CC_{50} (μM) (viabilidad celular)
Neomicina B	>100	>100
JB-391	>50<100	>100
JB-398	>100	>100
SC-30	>50<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	32,3	>100
Int. conf. 95 %	20,6-50,5	
R^2	0,7929	
IIS-806	64,1	>100
Int. conf. 95 %	49,2-83,5	
R^2	0,7861	

compuesto	CE ₅₀ (μM) (NL4,3-Ren)	CC ₅₀ (μM) (viabilidad celular)
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	24,8	>100
Int. conf. 95 %	18,7-32,8	
R ²	0,8928	

Compuesto	Tabla 3b				
	IIS-420	IIS-375	IIS-758	IIS-771	JB-391
EC ₅₀ postintegración (μM)	5,0	21,4	17,0	>100	>100
Int. conf. 95 %	0,7-34,0	15,3-29,9	3,6-80,7		
R ²	0,8648	0,9931	0,8629		

Tabla 3c

pCMV-Rev (ng) ^a	CI ₅₀ (IIS-420, RRE-Rev) (μM)
500	>50 <100
200	21,4 ± 6,3
20	10,4 ± 2,4

5 ^a Estos experimentos se realizaron con una concentración constante de pDM628 (500 ng/pocillo) y concentraciones decrecientes de pCMV-Rev

10 IIS-420 fue el inhibidor más potente del VIH-1, con un valor de CE₅₀ de 3,4 μM (Tabla 3a). Como se observa en los experimentos de inhibición de RRE-Rev₃₄₋₅₀ *in vitro*, los compuestos que contenían grupos hidrófobos (metilo o etilo) en el anillo central de benceno fueron también los compuestos más activos *in vivo*. El resto de los ligandos y la neomicina B no eran activos o presentaron actividades mucho más débiles a las concentraciones de ensayo. Ninguno de los compuestos demostró toxicidad celular a concentraciones inferiores a 100 μM (Tabla 3a y Figura 6a).

15 Con el fin de evaluar la actividad de los compuestos en etapas postintegración del ciclo de vida del virus, se realizó un ensayo basado en la transfección de un clon de VIH-1 competente de larga duración, donde se omiten etapas tempranas de la infección y solo se producen eventos postintegración del ciclo del virus. IIS-420, con un valor de CE₅₀ de 5,0 μM, fue el compuesto más potente en este ensayo, seguido de IIS-758 y IIS-375 (Tabla 3b y Figura 6b). Las CE₅₀ de estos terfenilos fueron similares a las obtenidas con el experimento de infección (Tabla 3a), lo que indica que su diana principal estaba contenida en etapas transcripcionales o postranscripcionales del ciclo infeccioso del virus, como es el caso para el sistema RRE-Rev.

5. El terfenilo sustituido bilateralmente IIS-420 inhibe el sistema RRE-Rev ex vivo.

25 Se realizó un ensayo basado en plásmidos de transfección que codifican Rev y un sistema indicador RRE-luciferasa. Los resultados indicaron que IIS-420 inhibió el transporte mediado por Rev de ARN que contiene RRE desde el núcleo al citoplasma. Los valores de CI₅₀ variaron entre 10,4 y 21,4 μM y dependían de la concentración del plásmido que codifica Rev utilizado en el ensayo (Tabla 3c y Figura 6c). Este resultado establece claramente la inhibición celular de la función de la ribonucleoproteína RRE-Rev.

30 6. Los terfenilos sustituidos bilateralmente inhiben la transcripción mediada por el promotor LTR de VIH-1.

35 Se realizó un ensayo basado en la transfección de un plásmido LTR-Luc (26) para evaluar si los terfenilos inhibieron la transcripción mediada por el promotor de repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) del VIH-1. Los terfenilos IIS-358, IIS-758 y IIS-420 inhibieron la transcripción del gen indicador (Figura 6d).

Aunque los datos disponibles son coherentes con un efecto antivírico basado en la inhibición de RRE-Rev, estos resultados demuestran que los terfenilos sustituidos bilateralmente también inhiben la transcripción controlada por el

promotor LTR de VIH-1.

7. Los terfenilos sustituidos bilateralmente presentan actividad antibiótica.

- 5 La actividad antibiótica de compuestos de bifenilo y terfenilo seleccionados se realizó usando un ensayo de difusión en disco convencional (27). Las susceptibilidades de disco observadas indicaron que el terfenilo sustituido bilateralmente IIS-420 tenía una actividad débil pero significativa tanto contra bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*) como grampositiva (*Staphylococcus aureus*). Por el contrario, los bifenilos JB-391 y SC-30 y los 2'-metoxi terfenilos IIS-358 y IIS-478 eran inactivos (Tabla 4). Este resultado demuestra que los compuestos sustituidos
10 bilateralmente de la invención pueden usarse como agentes antibacterianos nuevos.

Tabla 4. Susceptibilidad en disco comparativa de *E. coli* y *S. aureus* a cinco antibióticos, los bifenilos JB-391 y SC-30 y los terfenilos IIS-478, IIS-358 y IIS-420.

Compuesto ^a	<i>E. coli</i> ^{b,c}	<i>S. aureus</i> ^{b,c}
Ampicilina	25,6 ± 1,7	38,1 ± 1,6
Tobramicina	18,8 ± 2,2	17,6 ± 0,8
Kanamicina A	22,0 ± 2,0	16,5 ± 1,1
Kanamicina B	20,0 ± 2,1	16,7 ± 1,2
Neomicina B	15,2 ± 2,1	12,8 ± 1,9
IIS-420	9,3 ± 0,4	9,8 ± 0,4

15 ^a Las potencias en disco fueron de 20 µg de compuesto en todos los casos.

^b Los valores representan el promedio y la desviación típica de 2-10 experimentos independientes.

^c JB-391, SC-30, IIS-478 y IIS-358 fueron inactivos en este ensayo.

Obtención de las composiciones farmacéuticas de la presente invención

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera 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 de acuerdo con la presente invención incluye más etapas, tales como encapsulado liposómico.

25 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, opcionalmente mezclado con componentes, tales como aglutinantes, lubricantes, diluyentes
30 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 vehículo adecuado.

35 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 componente, por ejemplo, tal como un alcohol polihidroxilado, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

40 Las formulaciones para administración rectal pueden prepararse con un vehículo convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca registrada comercial). 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).

45 Como alternativa, los compuestos de la presente invención pueden prepararse en liposomas 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, de acuerdo con sea necesario. Se detallan técnicas de encapsulado liposómico en el libro de Claudio Nastruzzi "*Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications*" (Boca Raton 2005, publicado por CRC Press) y en "*Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications*" de Lasic y Papahadjopoulos (1998 Ámsterdam, NY, publicado por Elsevier).
50

Ejemplos

La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de trabajo, que son realizaciones preferidas de la invención.

5

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

El análisis conformacional de una molécula terfenilica hexaquis-sustituida con grupos bilaterales se realizó utilizando el campo de fuerzas Merck MMFF94 (28) 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 potencial de los confórmeros. Los cálculos de *docking* de moléculas bi- y terfenilicas con diferentes patrones de sustitución se realizaron utilizando la estructura de RRE IETF (7) y el algoritmo Dock 5.0 (29).

Para obtener un modelo mejorado de complejos RRE-terfenilo, se realizaron cálculos de *docking* con los programas Autodock 3.05 (30) y Gold 5.0 (31), guiados por las restricciones basadas en las NOE intermoleculares observadas por espectroscopía de RMN. Basándose en los datos de RMN (Figura 3), el sitio de unión de los ligandos se definió alrededor del nucleótido C20. Un ejemplo ilustrativo de estos cálculos se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 2: Preparación de muestras de ARN y péptido.

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 (HEPES 10 mM pH 7,40, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y surfactante P-20 al 0,005 % (v/v)) antes de su inmovilización.

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 de resto Rev₃₄₋₅₀ rico en argininas que forma la α-hélice de unión a ARN de Rev (21). Con el fin de poner a punto los experimentos de FP y SPR, se utilizó un péptido similar, pero sin marcar, 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-hélice (22).

35

Ejemplo 3: Experimentos de SPR.

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron a 25 °C en un equipo Biacore T100 (GE Healthcare), empleando chips de cuatro canales derivatizados con estreptavidina de 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 aproximadamente 300 unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés) 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 acuosas compuestas por 0,5-1,0 M NaCl y 10-100 mM NaOH, dependiendo del ligando.

45

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:

50

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

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

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 flujo (32). La ecuación de dos sitios de unión únicamente fue

55

empleada en caso de mejorar significativamente el ajuste obtenido con el 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 referenciados (33). Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Figura 2.

5

Ejemplo 4: Espectroscopia de RMN.

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 (Bruker Biospin) y Sparky 3,110 (34). 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 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.

10

15

Los complejos de RRE con los mejores ligandos (IIS-420, IIS-375 e IIS-806) se estudiaron empleando mayor concentración de ARN (0,12 mM) y relaciones molares RRE:terfenilo 1:1 y 1:4. 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 experimentos fueron obtenidos en D_2O a varias temperaturas (entre 2 y 46 $^\circ\text{C}$).

20

Ejemplo 5: Experimentos de polarización de fluorescencia.

25

La capacidad de los ligandos bifenílicos y terfenílicos de inhibir la interacción RRE-Rev_{34-5n} se evaluó mediante un ensayo de desplazamiento basado en anisotropía de fluorescencia. Los experimentos se realizaron a 25 $^\circ\text{C}$ utilizando un lector de placas Víctor X5 (Perkin Elmer Inc.) provisto de filtros de excitación y emisión de 480 y 535 nm, respectivamente. El tampón utilizado para estos ensayos contenía 30 mM HEPES (pH 6,8), 100 mM KCl, 10 mM fosfato sódico, 10 mM acetato amónico, 10 mM cloruro de guanidinio, 2 mM MgCl_2 , 20mM NaCl, 0,5 mM EDTA y 0,001 % (v/v) Triton X-100³⁹.

30

La horquilla de RRE (SEQ ID No. 1; a una concentración de 2 o 60 nM) y frevp (SEQ ID No. 5; 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 CI_{50} fueron calculados ajustando la anisotropía observada (A_{obs}) a la siguiente ecuación mediante el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.):

35

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

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, CI_{50} es la concentración de inhibidor necesaria para producir una inhibición del 50 %, y m es la pendiente de la parte lineal de la curva sigmoidea.

40

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

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

donde $[L]_t$ es la concentración total de frevp (10 nM) y K_d es la constante de disociación RRE-frevp, $4,6 \pm 1,3$ nM. Este valor se obtuvo del ajuste con GraphPad Prism dos experimentos directos de unión de RRE-frevp en los que A se midió como una función de la concentración RRE en una concentración fija de frevp 10 nM. Los resultados de PF se muestran en la Figura 5 y en la Tabla 2.

45

Ejemplo 6: Plásmidos, virus y células.

50

Los plásmidos pNL4.3-Luc y pNL4.3 Ren se generaron mediante clonación de los genes de luciferasa y renilla, respectivamente, en la región nef del clon provírico pNL4.3 (36, 37). Se han clonado pCMV-Rev expresa Rev, y pDM628 es un plásmido indicador a base de luciferasa dependiente de Rev en el que el RRE y una secuencia que codifica luciferasa. En el plásmido LTR-Luc, la expresión del indicador de luciferasa depende del promotor LTR de VIH-1 (26).

55

Se cultivaron células MT-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina (50 UI/ml) y estreptomina (50 µg/ml) (todos de Whittaker MA Bio-Products). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y se dividieron dos veces a la semana.

5

Ejemplo 7: Ensayos celulares.

Evaluación de la actividad anti-VIH-1. Se obtuvieron sobrenadantes infecciosos mediante transfección de los plásmidos pNL4.3-Luc y pNL4.3-Ren en células 293T. Estos sobrenadantes fueron utilizados para infectar células en presencia de los compuestos que se han de evaluar. La cuantificación de la actividad anti-VIH se realizó 48 horas después de la infección. En resumen, las células se lisaron con 100 µl de tampón proporcionado por "Luciferase Assay System Kit with Reporter Lysis Buffer" (Promega, Madison, WI). Las unidades relativas de luminiscencia (RLU, por sus siglas en inglés) se obtuvieron en un luminómetro (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) después de añadir el sustrato a los extractos celulares. La viabilidad celular se evaluó con células tratadas de forma similar con las mismas concentraciones de compuesto. Después de 48 horas, la viabilidad se cuantificó mediante el sistema CellTiter Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones inhibitorias 50 (CE₅₀) y las concentraciones citotóxicas 50 % (CC₅₀) se calcularon usando el programa GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la Tabla 3a y la Figura 6a.

10

15

20

25

Ensayos de Transfección. Se mantuvieron células MT-2 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 µg/10⁶ células con un Easyject plus Electroporator (Equibio, Middlesex, UK). Después de la transfección, las células se cultivaron inmediatamente en RPMI con suero fetal bovino al 10 %, glutamina y antibióticos tratadas o no con diferentes concentraciones de compuestos y se recogieron 48 horas después. La actividad luciferasa (RLU) se midió en un luminómetro.

En los ensayos de evaluación de la actividad postintegración y la transcripción dependiente de LTR, un clon de VIH-1 competente de longitud completa o un plásmido LTR-Luc, respectivamente, se transfectó en presencia de compuestos. La inhibición RRE-Rev se analizó mediante transfección de plásmidos pCMV-Rev y pDM628. Los transcritos producidos tras la transcripción de pDM628 consistían en fragmentos que codifican el gen de la luciferasa y el RRE, donde ambos elementos estaban situados entre un donador de empalme y un aceptor de empalme. En presencia de Rev, la interacción RRE-Rev permite la exportación del transcrito al citoplasma, dando como resultado la expresión de luciferasa. Los resultados de ensayos de transfección se muestran en las Tablas 3b y 3c y las Figuras 6b, 6c y 6d.

30

35

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad antibiótica.

La actividad antibacteriana se midió de acuerdo con el método de Kirby-Bauer (27). Se extendieron uniformemente cultivos de *Escherichia coli* (ATCC 53868) o *Staphylococcus aureus* (ATCC 35556) sobre placas de agar. Se colocaron discos de 8 mm esterilizadas en la superficie de las placas y se impregnaron con 20 µl de una solución de compuesto 1 µg/µl. Después de la incubación de las placas durante 16-18 horas a 37 °C, se midió el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada disco. El ensayo se puso a punto con los antibióticos ampicilina, tobramicina, kanamicina A, kanamicina B y neomicina B. Las susceptibilidades en disco relativas de *E. coli* y *S. aureus* a estos agentes estaban de acuerdo con los valores publicados en la bibliografía (véase por ejemplo (38)). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

40

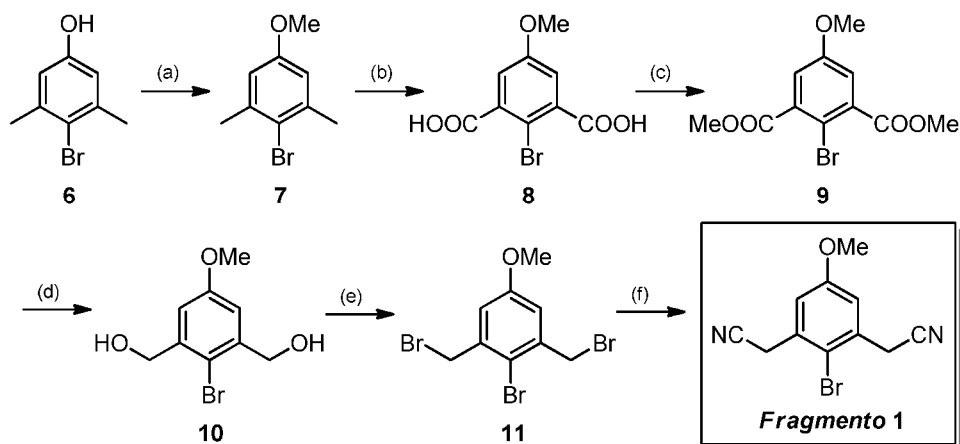
45

Ejemplo 9: Síntesis de compuestos bifenílicos y terfenílicos bilateralmente sustituidos.

Los fragmentos de partida **1** y **2** fueron piezas clave para la introducción de la agrupación amina 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 realizó la oxidación del éster metílico resultante. La esterificación del ácido carboxílico **8** dio lugar al compuesto **9**. La reducción de **9** con LiBH₄ (borohidruro de litio), seguida del tratamiento con NBS (*N*-bromosuccinimida) y NaCN (cianuro sódico) originó el fragmento **1** con buen rendimiento (Esquema 2).

50

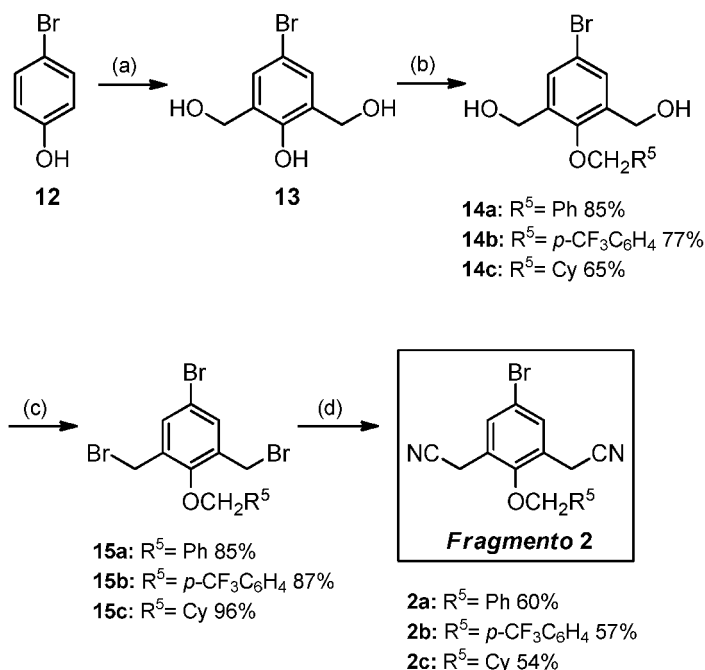
55



Reactivos y condiciones: (a) CH_3I , K_2CO_3 , acetona, reflujo, 12 h, cuantitativo; (b) KMnO_4 , $t\text{-BuOH:H}_2\text{O}$, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 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, $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$, 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 biblioteca de derivados 2 bromofenólicos O-protegidos.



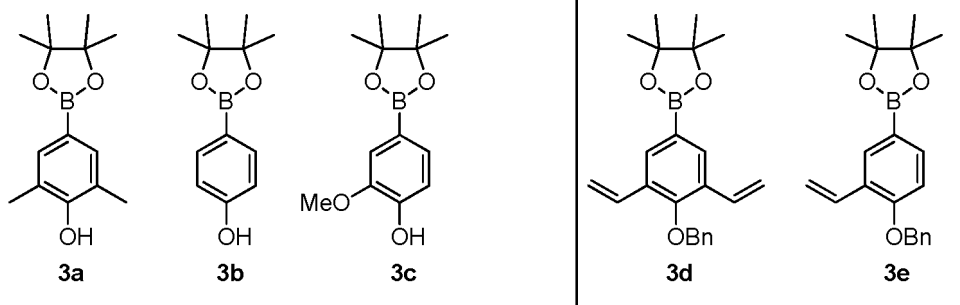
Reactivos y condiciones: (a) HCHO , aq NaOH 25 %, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 51 %; (b) BrCH_2R^5 , K_3PO_4 , acetona, temp. ambiente, 12 h; (c) NBS, PPh_3 , THF, temp. ambiente, 24 h; (d) NaCN, KI, éter 18-corona-16, $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$, temp. ambiente, 24 h.

Esquema 3

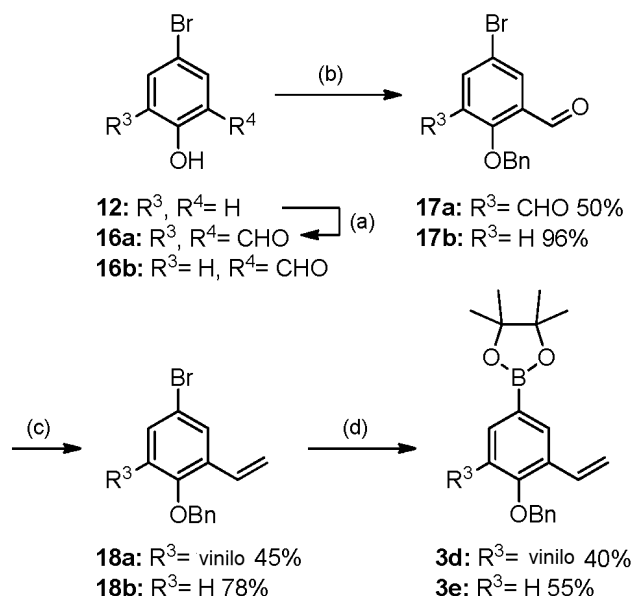
Como se mencionó anteriormente, la ruta sintética propuesta se basa en una secuencia de reacciones de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki mediante el empleo de diferentes ésteres aril borónicos. Los ésteres borónicos

3 utilizados proceden de fuentes comerciales a excepción de **3d** y **3e**.

Ésteres borónicos comerciales



- 5 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, posterior reacción de Wittig con MePh_3PBr , y por último, formación del éster borónico catalizada por paladio mediante radiación por microondas.



10

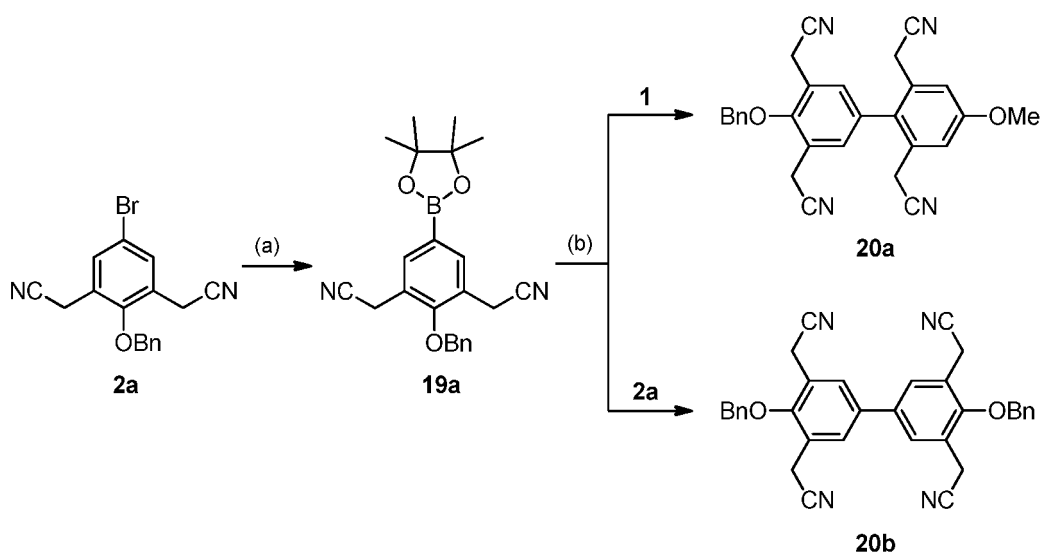
Reactivos y condiciones: (a) Reacción de Duff, TFA, hexametilentetramina, 150 °C, 48 h, 50 %; (b) BrBn , K_3PO_4 , acetona, reflujo, 8 h; (c) MePh_3PBr , NaH , THF, 0 °C, 16 h; (d) bis(pinacolato) de boro, KOAc, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, dioxano, 30 min, 120 °C microondas.

15

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.

20



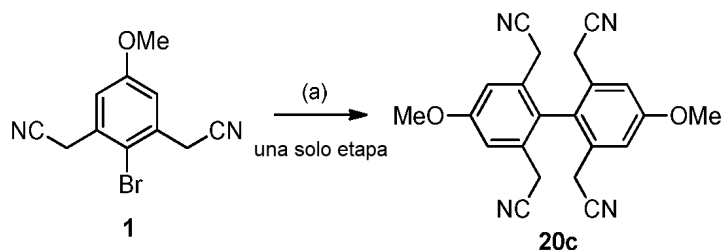
Reactivos y condiciones: (a) bis(pinacolato) de boro, KOAc, PdCl₂(dppf), DME, 30 min, 120 °C microondas, 60 %; (b) Pd(OAc)₂, PPh₃, K₃PO₄, DMSO, 1-2 h, 125 °C microondas, **20a** 42 %, **20b** 44 %.

5

Esquema 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 bifenílos **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).

10



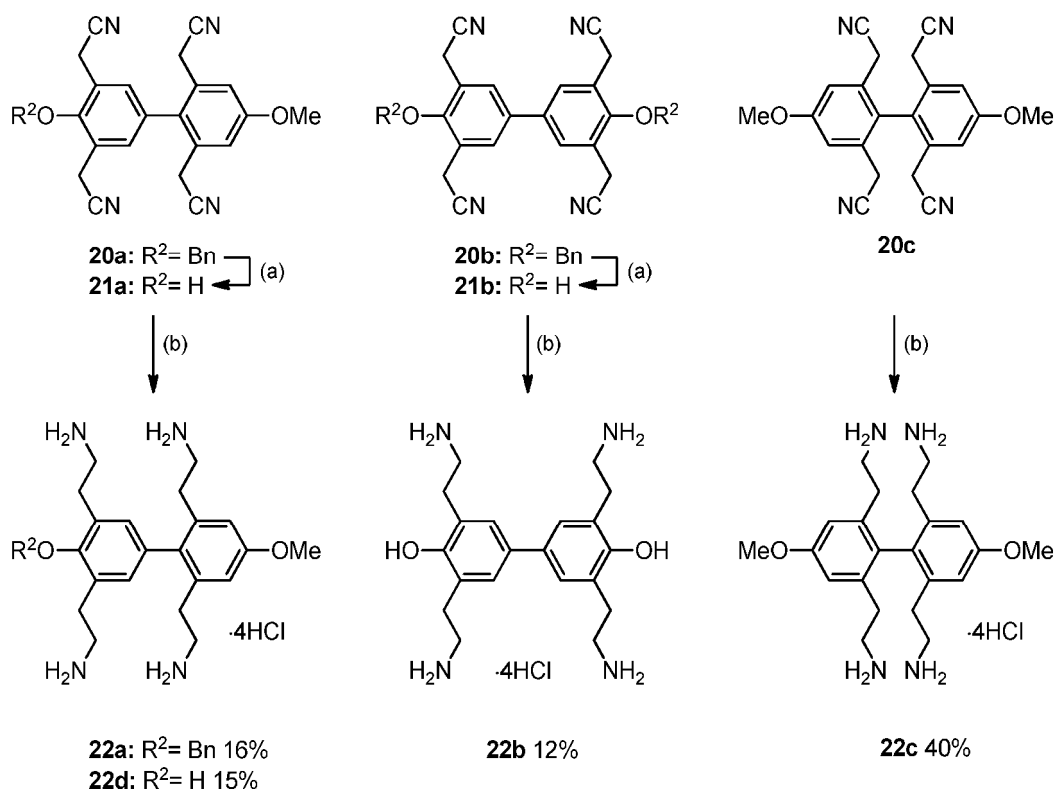
15

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

Esquema 6

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**.

20



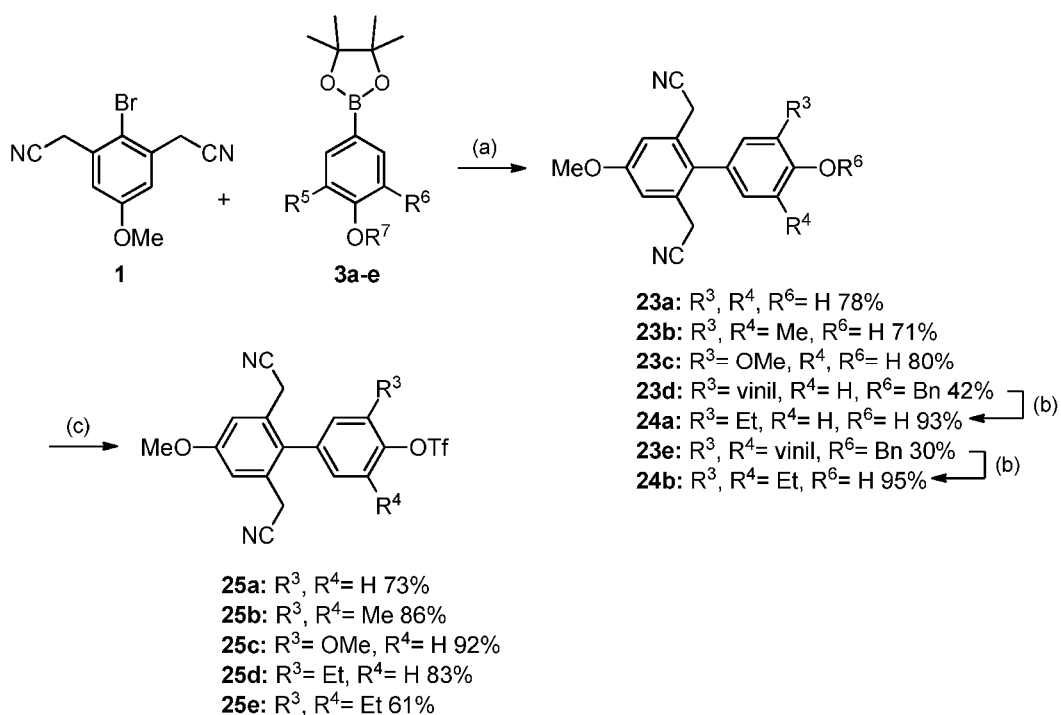
Reactivos y condiciones: (a) Pd/C (10 mol %), H₂ 1 atm, temp. ambiente, 2 h, cuantitativo; (b) BH₃, THF, reflujo, 5 días después HCl 4 M en dioxano.

5

Esquema 7

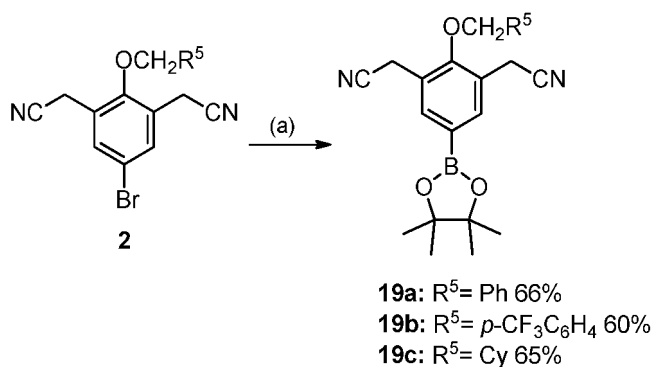
Basándose en la estrategia sintética propuesta, el terfenilo deseado **5** se preparó como se indica a continuación. En primer lugar, se realizó la reacción de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki entre el sintón de partida **1** y los distintos ésteres aril borónicos **3a-e** empleando las condiciones 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 realizó 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).

15



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

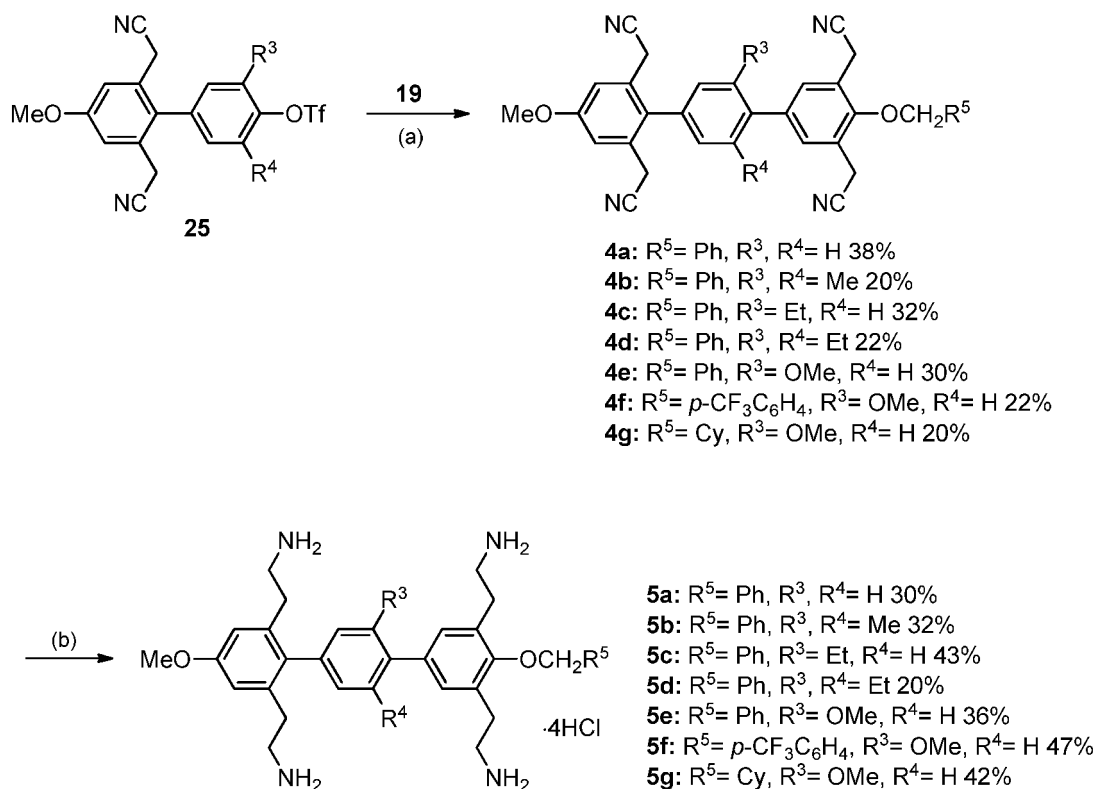
Esquema 8



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

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 BH₃/THF seguida de un tratamiento con HCl 4M en dioxano.



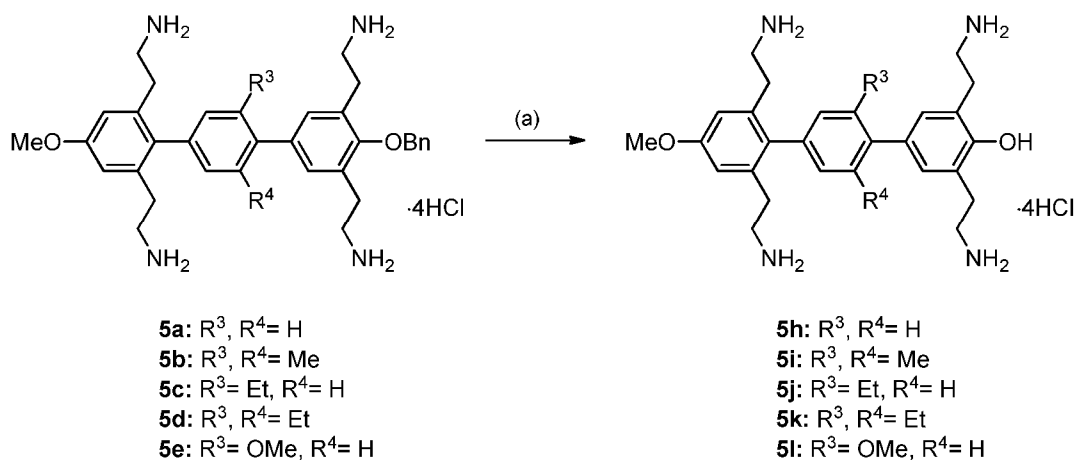
Reactivos y condiciones: (a) K₃PO₄, PdCl₂(dppf), CH₃CN:H₂O (7:3), 30 min, 120 °C microondas; (b) BH₃, THF, reflujo, 5 días después HCl 4 M en dioxano.

5

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-l** de forma cuantitativa, tal como se muestra en el Esquema 11. De esta manera, se ha preparado una variada biblioteca de bi-y terfenilos estratégicamente funcionalizados.

10

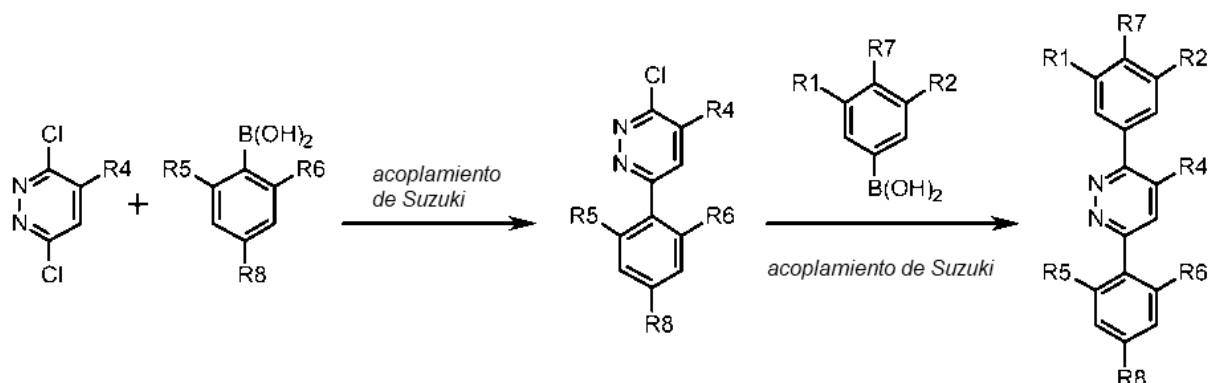


15 Reactivos y condiciones: (a) Pd/C (10 mol %), H₂ 1 atm, temp. ambiente, 2 h, cuantitativo.

Esquema 11

20 Otros compuestos tricíclicos unidos 1,4 sustituidos bilateralmente que contienen anillos distintos del benceno se pueden preparar de forma similar usando reacciones de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura secuenciales. Por

ejemplo, la síntesis de compuestos de 3,6-difenil-piridazina implica acoplamientos cruzados de derivados de 3,6-dicloropiridazina disponibles en el mercado y ácidos aril-borónicos:



5

Preparación de bifenilos **23** y **24**

Una mezcla del éster borónico correspondiente **3a-e** (1,1 equiv.), haluro de arilo **1** (1 equiv.) y PdCl₂(dppf) (10 % en moles) se disolvió en MeCN:H₂O (7:3) (0,15 M) y se añadió K₃PO₄ (3 equiv.). La mezcla se calentó a 120 °C en un horno de microondas durante 30 minutos. Después de enfriar, la fase orgánica se decantó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice empleando mezclas de n-hexano:EtOAc como eluyentes.

Hidrogenólisis de éter bencilico para obtener fenoles **24a-b**

La mezcla del correspondiente compuesto bencilado **23** (1 equiv.) y Pd(OH)₂ al 20 % en peso (0,5 equiv.) en etanol (0,1 M) se agitó en atmósfera de hidrógeno a 10 atm (1,01 MPa) durante 20 horas. La mezcla se filtró y se lavó con EtOAc. La fase orgánica se evaporó para proporcionar el producto **24a-b** sin purificación adicional.

Procedimiento para la reacción de triflación

A una solución del fenol **24** correspondiente (1 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (0,2 M) se le añadieron piridina (2,5 equiv.) y anhídrido trifluorometanosulfónico (1,2 equiv.) gota a gota a 0 °C. Después de la adición completa, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se dejó agitar durante 90 minutos. Después, la mezcla se diluyó con Et₂O, se inactivó con HCl al 10 % ac. y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna empleando mezclas de n-hexano:EtOAc como eluyentes.

Procedimiento general para la síntesis de terfenilo

Una mezcla del éster borónico **19** correspondiente (1,2 equiv.), triflato **25** (1 equiv.), K₃PO₄ (3 equiv.) y PdCl₂(dppf) (al 10 % en moles) se disolvió en MeCN:H₂O (7:3) (0,15 M). La mezcla se calentó a 120 °C en un horno de microondas durante 30 minutos. Después de enfriar, la fase orgánica se decantó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna empleando mezclas de n-hexano:EtOAc como eluyentes.

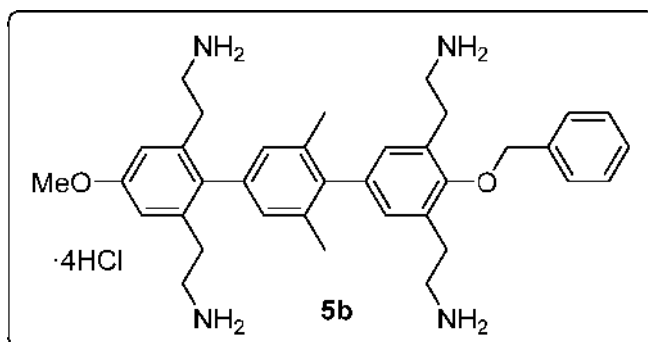
Procedimiento general para la reducción de nitrilo

Se disolvió compuesto de nitrilo **4** (1 equiv.) en THF anhidro (0,05 M), después se añadió solución de complejo borano THF 1 M (12 equiv.) y la mezcla se sometió a reflujo en atmósfera de N₂ durante 5 días. Después de ese tiempo, se añadió HCl 4 M en dioxano (16 equiv.) y la mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas. La solución acuosa se lavó varias veces con CH₂Cl₂ y después se evaporó a vacío. El sólido recuperado se disolvió en MeOH y se precipitó mediante la adición de Et₂O.

Procedimiento general para la eliminación del grupo bencilo

La mezcla del clorhidrato de **5a**, **5b**, **5c**, **5d** o **5e** (1 equiv.) y Pd/C al 10 % en peso (al 10 % en moles) en MeOH (0,03 M) se agitó en atmósfera de H₂ (1 atm (0,10 MPa)) durante 1 hora. La mezcla se filtró y se lavó con MeOH. La fase orgánica combinada se evaporó para proporcionar el producto final en forma de un sólido de color blanco. No fue necesaria ninguna purificación adicional.

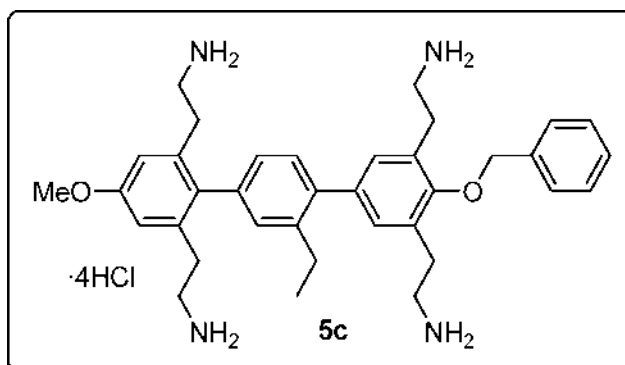
Clorhidrato de 2,2',2'',2'''-[4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-(1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetrail]tetraetanamina (IIS-375) (5b)



5 Se sintetizó clorhidrato de 2,2',2'',2'''-[4''-(benciloxi)-4-metoxi-3',5'-dimetil-(1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetrail]tetraetanamina siguiendo el método anterior partiendo de **4b**. El producto en bruto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 32 %).

10 F_R : 0 (MeOH). RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ = δ 7,60-7,32 (m, 5H), 7,02 (s, 2H), 6,93 (s, 2H), 6,83 (s, 2H), 4,99 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,08-2,92 (m, 8H), 2,84-2,82 (m, 4H), 2,71-2,62 (m, 4H), 2,09 (s, 6H), RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ = δ 180,4, 160,4, 155,9, 141,4, 139,4, 139,3, 138,7, 137,5, 135,7, 133,7, 131,3, 130,1, 129,6, 129,3, 129,1, 129,1, 114,4, 77,0, 62,4, 55,8, 42,6, 42,4, 35,7, 32,6, 24,3, 21,2. EMAR (IEN) calculado para $C_{36}H_{47}N_4O_2$ $[M+H]^+$: 567,3699. Encontrado: 567,3653. Punto de fusión: >300 °C.

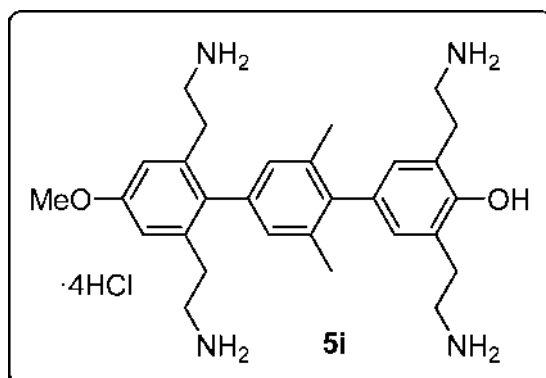
15 **Clorhidrato de 2,2',2'',2'''-[4''-(benciloxi)-4-metoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetrail]tetraetanamina (IIS-758) (5c)**



20 Se sintetizó clorhidrato de 2,2',2'',2'''-[4''-(benciloxi)-3'-etil-4-metoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-2,3'',5'',6-tetrail]tetraetanamina siguiendo el método anterior partiendo de **4c**. El producto en bruto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 43 %).

25 F_R : 0 (MeOH). 1H RMN (300 MHz, D_2O) δ = 7,62-7,50 (m, 5H), 7,45 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,22-7,14 (m, 1H), 7,05 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,37-3,25 (m, J = 7,3 Hz, 4H), 3,21-3,01 (m, J = 16,2, 8,7 Hz, 8H), 2,93-2,79 (m, 4H), 2,72 (c, J = 15,0, 7,5 Hz, 2H), 1,14 (t, J = 7,5 Hz, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ = 158,5, 153,9, 142,7, 139,6, 138,5, 137,8, 137,0, 136,0, 134,9, 130,8, 130,6, 130,4, 129,3, 129,2, 129,1, 127,3, 114,3, 76,6, 61,6, 55,7, 40,0, 39,8, 39,6, 31,4, 28,2, 28,0, 25,9, 15,3. EMAR (IEN) calculado para $C_{36}H_{47}N_4O_2$ $[M+H]^+$: 567,3699. Encontrado: 567,3694. Punto de fusión: 282-286 °C.

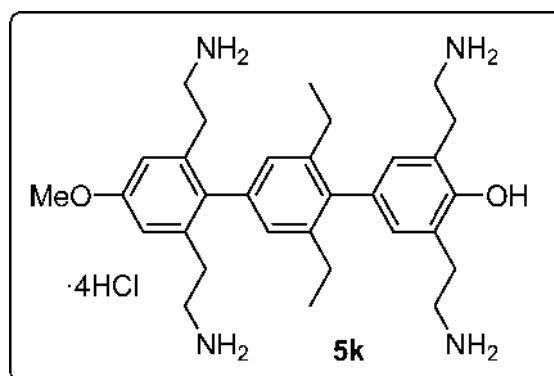
30 **Clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraquis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol (IIS-420) (5i)**



5 Se sintetizó clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraakis(2-aminoetil)-4''-metoxi-2',6'-dimetil-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol siguiendo el método anterior partiendo de **5b**. El producto en bruto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 99 %).

FR: 0 (MeOH).RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ = δ 7,13 (s, 1H), 6,86 (s, 2H), 6,75 (d, J = 3,8 Hz, 5H), 3,81 (s, 3H), 2,99 (d, J = 5,8 Hz, 4H), 2,85 (d, J = 5,8 Hz, 4H), 2,77-2,64 (m, 4H), 2,64-2,50 (m, 4H), 2,05 (s, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ = 160,1, 155,9, 142,1, 140,1, 139,3, 137,6, 135,9, 132,1, 131,1, 130,1, 129,0, 128,4, 114,0, 66,9, 58,3, 55,7, 43,5, 42,8, 42,7, 37,6, 35,1, 21,3, 18,4, 15,4. EMAR (IEN) calculado para C₂₉H₄₁N₄O₂ [M+H]⁺: 478,3230. Encontrado: 478,3169. Punto de fusión: >300 °C.

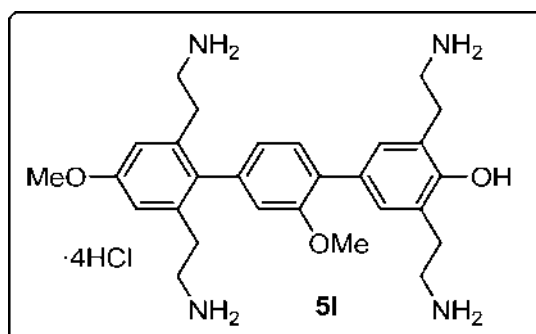
Clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol (IIS-806) (5k)



15 Se sintetizó clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraakis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4''-metoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol siguiendo el método anterior partiendo de **5d**. El producto en bruto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 99 %).

FR: 0 (MeOH). RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ = 7,45 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,36-7,28 (m, 3H), 7,21 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,05 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,46-3,35 (m, 4H), 3,23-3,14 (m, 4H), 3,13-3,02 (m, 4H), 2,93-2,80 (m, 4H), 2,74 (c, J = 7,5 Hz, 4H), 1,15 (t, J = 7,5 Hz, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ = 158,5, 151,3, 142,8, 139,8, 137,5, 137,0, 134,9, 130,7, 130,5, 130,4, 127,3, 125,7, 114,2, 61,6, 55,7, 49,0, 40,0, 39,6, 31,4, 28,2, 27,9, 25,8, 15,2. EMAR (IEN) calculado para C₃₁H₄₅N₄O₂ [M+H]⁺: 505,3543. Encontrado: 505,3478. Punto de fusión: >300 °C.

25 **Clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraakis(2-aminoetil)-2',4''-dimetoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol (IIS-358) (5l) (comparativo)**



30 Se sintetizó clorhidrato de 2'',3,5,6''-tetraakis(2-aminoetil)-2',4''-dimetoxi-(1,1':4',1''-terfenil)-4-ol siguiendo el método

anterior partiendo de **5e**. El producto en bruto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 99 %).

F_R : 0 (MeOH). RMN 1H (300 MHz, MeOD) δ = 7,38-7,35 (m, 3H), 6,85-6,80 (m, 4H), 3,91 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 2,72-2,81 (m, 4H), 2,92-3,01 (m, 4H), 3,08-3,11 (m, 4H), 3,15-3,26 (m, 4H). RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) δ = 161,8, 157,8, 155,9, 142,9, 142,6, 134,8, 128,5, 128,4, 127,9, 124,0, 121,9, 121,0, 112,6, 111,4, 56,8, 56,0, 42,0, 34,9, 30,1. EMAR (IEN) calculado para $C_{28}H_{39}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 479,3022. Encontrado: 479,2965. Punto de fusión: >300 °C.

Referencias

- 10 1. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. *The challenge of finding a cure for VIH infection. Science*. 2009; 323(5919): 1304-7.
2. Ward CJ. *New drugs for VIH-1: challenges and novel candidates. Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8(10): 1093-5.
3. Sharp PA. *The centrality of RNA. Cell*. 2009; 136(4): 577-80.
- 15 4. Gallego J, Varani G. *Targeting RNA with Small Molecule Drugs: Therapeutic Promise and Chemical Challenges. Acc Chem Res*. 2001; 34: 836-43.
5. Guan L, Disney MD. *Recent advances in developing small molecules targeting RNA. ACS Chem Biol*. 2012; 7(1): 73-86.
6. Hermann T. *Drugs targeting the ribosome. Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15(3): 355- 66.
- 20 7. Battiste JL, Mao H, Rao NS, Tan R, Muhandiram DR, Kay LE, et al. *a Helix-RNA Major Groove Recognition in an VIH-1 Rev Peptide-RRE RNA Complex. Science*. 1996; 273: 1547-51.
8. Daugherty MD, Liu B, Frankel AD. *Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by VIH Rev. Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17(11): 1337-42.
9. DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Rader C, Wingfield PT, Stuart DI, et al. *Implications of the VIH-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. Proc Natl Acad Sci USA*. 25 2010; 107(13): 5810-4.
10. Daugherty MD, D'Orso I, Frankel AD. *A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional VIH Rev oligomer on RNA. Mol Cell*. 2008; 31(6): 824-34.
11. Groom HC, Anderson EC, Lever AM. *Rev: beyond nuclear export. J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 6): 1303-18.
- 30 12. Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Uberla K. *Nuclear RNA export and packaging functions of VIH-1 Rev revisited. J Virol*. 2010; 84(13): 6598-604.
13. Levin A, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A. *Nucleocytoplasmic shuttling of VIH-1 integrase is controlled by the viral Rev protein. Nucleus*. 2010; 1(2): 190-201.
14. Thomas JR, Hergenrother PJ. *Targeting RNA with small molecules. Chem Rev*. 2008; 108(4): 1171-224.
- 35 15. Yin H, Lee GI, Park HS, Payne GA, Rodriguez JM, Sebtí SM, et al. *Terphenyl- based helical mimetics that disrupt the p53/HDM2 interaction. Angewandte Chemie- International Edition*. 2005; 44(18): 2704-7.
16. Suzuki A. *Carbon-carbon bonding made easy. Chem Commun*. 2005(38): 4759-63.
17. Leadbeater N. *Fast, easy, clean chemistry by using water as a solvent and microwave heating: the Suzuki coupling as an illustration. Chem Commun*. 2005(23): 2881 -902.
- 40 18. Nicolaou KC, Bulger PG, Sarlah D. *Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in Total Synthesis. Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44(29): 4442-89.
19. Tanius FA, Nguyen B, Wilson WD. *Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. Methods Cell Biol*. 2008; 84: 53-77.
20. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, et al. *VIH-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. EMBO J*. 1990; 9(12): 4145-53.
- 45 21. Kjems J, Calnan BJ, Frankel AD, Sharp PA. *Specific binding of a basic peptide from VIH-1 Rev. EMBO J*. 1992; 11(3): 1119-29.
22. Tan R, Chen L, Buettner JA, Hudson D, Frankel AD. *RNA recognition by an isolated alpha helix. Cell*. 1993; 73(5): 1031-40.
- 50 23. Lacourciere KA, Stivers JT, Marino JP. *Mechanism of neomycin and Rev peptide binding to the Rev responsive element of VIH-1 as determined by fluorescence and NMR spectroscopy. Biochemistry*. 2000; 39(19): 5630-41.
24. Hendrix M, Priestley ES, Joyce GF, Wong CH. *Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. J Am Chem Soc*. 1997; 119(16): 3641 -8.
- 55 25. Peterson RD, Feigon J. *Structural Change in Rev Responsive Element RNA of VIH- 1 on Binding Rev Peptide. J Mol Biol*. 1996; 264: 863-77.
26. Hazan U, Thomas D, Alcamí J, Bachelier F, Israel N, Yssel H, et al. *Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(20): 7861-5.
- 60 27. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol*. 1966; 45(4): 493-6.
28. Halgren TA. *Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. Journal of Computational Chemistry*. 1996; 17(5- 6): 490-519.
29. Moustakas DT, Lang PT, Pegg S, Pettersen E, Kuntz ID, Brooijmans N, et al. *Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2006; 20(10-11): 601 -19.
- 65

30. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. *Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function*. *J Comp Chem*. 1998; 19: 1639-62.
- 5 31. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. *Improved protein- ligand docking using GOLD*. *Proteins*. 2003; 52(4): 609-23.
32. Nguyen B, Tanious FA, Wilson WD. *Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions*. *Methods*. 2007; 42(2): 150-61.
33. Myszka DG. *Improving biosensor analysis*. *J Mol Recognit*. 1999; 12(5): 279-84.
34. Goddard TD, Kneller DG. *Sparky 3.110*. University of California, San Francisco, EE.UU. 2004.
- 10 35. Luedtke NW, Tor Y. *Fluorescence-based methods for evaluating the RNA affinity and specificity of VIH-1 Rev-RRE inhibitors*. *Biopolymers*. 2003; 70(1): 103-19.
36. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. *Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone*. *J Virol*. 1986; 59(2): 284-91.
- 15 37. 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 susceptibility of human immunodeficiency virus type 1*. *J Med Virol*. 2007; 79(2): 127- 37.
- 38 Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. *Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1973; 3(3): 418-24.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
 INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
 25 UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA \223SAN VICENTE MÁRTIR\224
 UNIVERSITAT DE VALENCIA
- <120> NUEVOS p-TERFENILOS HEXAQUIS-SUSTITUIDOS CON GRUPOS BILATERALES PARA EL
 30 TRATAMIENTO DE LA INFECCIN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1) Y
 OTRAS ENFERMEDADES
- <130> VIH1
- <160> 5
- 35 <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
 <211> 28
 40 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <221> Fuente
 45 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial"
 /nota="GCUGGGCGCACUUCGGUGACGGUACAGC"
 /tipo de mol="ARN sin asignar"
- 50 <400> 1
 gcugggcgca cuucggugac gguacagc 28
- <210> 2
 <211> 26
 55 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <221> Fuente
 60 <222> 1..26
 <223> /organismo="Secuencia artificial"
 /nota="GCUGGGCGGACUUCGGUGCGCCCAGC"
 /tipo de mol="ARN sin asignar"
- 65 <400> 2

ES 2 672 218 T3

gcuggggcgga cuucggugcg cccagc 26

<211> 27
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> Fuente
 <222> 1..27
 <223> /organismo="Secuencia artificial"
 /nota="GCUGAUCUGACACUUCGGUGUCU CAGC"
 /tipo de mol="ARN sin asignar"

10 <400> 3

gcugaucuga cacuucggug ucucagc 27

15 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <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										

25 20

<210> 5
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> FITCGTRQARRNRRRRWRERQRAAAAR

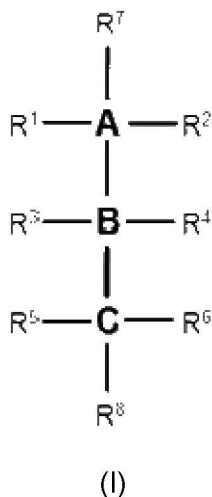
35 <400> 5

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

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula (I)



5

o una sal, éster, solvato o hidrato farmacéutico del mismo.
 en la que

A, B y C son benceno,

10 R^1 y R^2 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno A y en meta en relación con el átomo de carbono de A unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo y aminopropilo opcionalmente sustituidos;

15 R^3 y R^4 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno B y en orto en relación con el átomo de carbono de B unido al benceno A; y se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilamida (C1-C6), éster de alquilo (C1-C6), hidroxialquilo (C1-C6), haloalquilo (C1-C6), alcoxialquilo (C1-C6), alquilo (C1-C8), con la condición de que al menos uno de R^3 y R^4 no sea hidrógeno;

15 R^5 y R^6 están en disustitución 1,3 bilateral uno con respecto al otro en el benceno C y en orto en relación con el átomo de carbono de C unido al benceno B; y se seleccionan independientemente entre aminometilo, aminoetilo y aminopropilo opcionalmente sustituidos;

20 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi (C1-C10), alquilamina (C1-C10), alquilguanidina (C1-C10), alquilamida (C1-C10), éster de alquilo (C1-C10), hidroxialquilo (C1-C10), alcoxialquilo (C1-C10), haloalquilo (C1-C10), alquilo (C1-C10), aril alcoxi y éster de arilo

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre:

25 2",3,5,6"-tetraquis(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)tetraetanamina
 2",3,5,6"-tetraquis(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)tetraetanamina
 2",3,5,6"-tetraquis(2-aminoetil)-2',6'-dietil-4"-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-4-ol
 30 2,2',2",2"'-(4"-(benciloxi)-3',5'-dietil-4-metoxi-[1,1':4',1"-terfenil]-2,3",5",6-tetrail)tetraetanamina
 o una sal, éster, solvato o hidrato farmacéutico del mismo.

3. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso como medicamento.

35 4. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH-1; infecciones causadas por VIH-2, el virus del síndrome respiratorio agudo grave, el virus de la hepatitis C, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la polio, el virus de la gripe, el virus del ébola, el virus paragrupal humano, el rotavirus o por bacterias grampositivas y gramnegativas; el neuroblastoma, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello, el
 40 mieloma múltiple, el cáncer de células renales, el linfoma de Burkitt, el cáncer de colon, el hepatocarcinoma; infecciones por el virus del herpes simple, la hipertensión, la psoriasis, el asma, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la fibromialgia, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

45 5. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por VIH-1.

6. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas.

7. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o una sal, éster, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH-1; infecciones causadas por VIH-2, el virus del síndrome respiratorio agudo grave, el virus de la hepatitis C, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la polio, el virus de la gripe, el virus del ébola, el virus paragripal humano, el rotavirus o por bacterias grampositivas y gramnegativas; el neuroblastoma, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello, el mieloma múltiple, el cáncer de células renales, el linfoma de Burkitt, el cáncer de colon, el hepatocarcinoma; infecciones por el virus del herpes simple, la hipertensión, la psoriasis, el asma, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la fibromialgia, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.
- 10
- 15 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 formulada para la administración parenteral, oral, tópica, nasal, vaginal o rectal.
10. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 formulada para la administración parenteral, oral, tópica, nasal, vaginal o rectal.
- 20
11. Método para la preparación de los compuestos de fórmula (I) como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende la formación de enlaces C-C secuenciales a través del acoplamiento de Suzuki catalizado por paladio de haluros, triflatos de arilo y ésteres borónicos de los anillos A, B y C sustituidos bilateralmente donde R¹, R², R⁵ y R⁶ de la molécula final de fórmula (I) son introducidos por los derivados de haluro de A y C y R³ y R⁴ se introducen por el éster borónico de B.
- 25

FIGURA 1

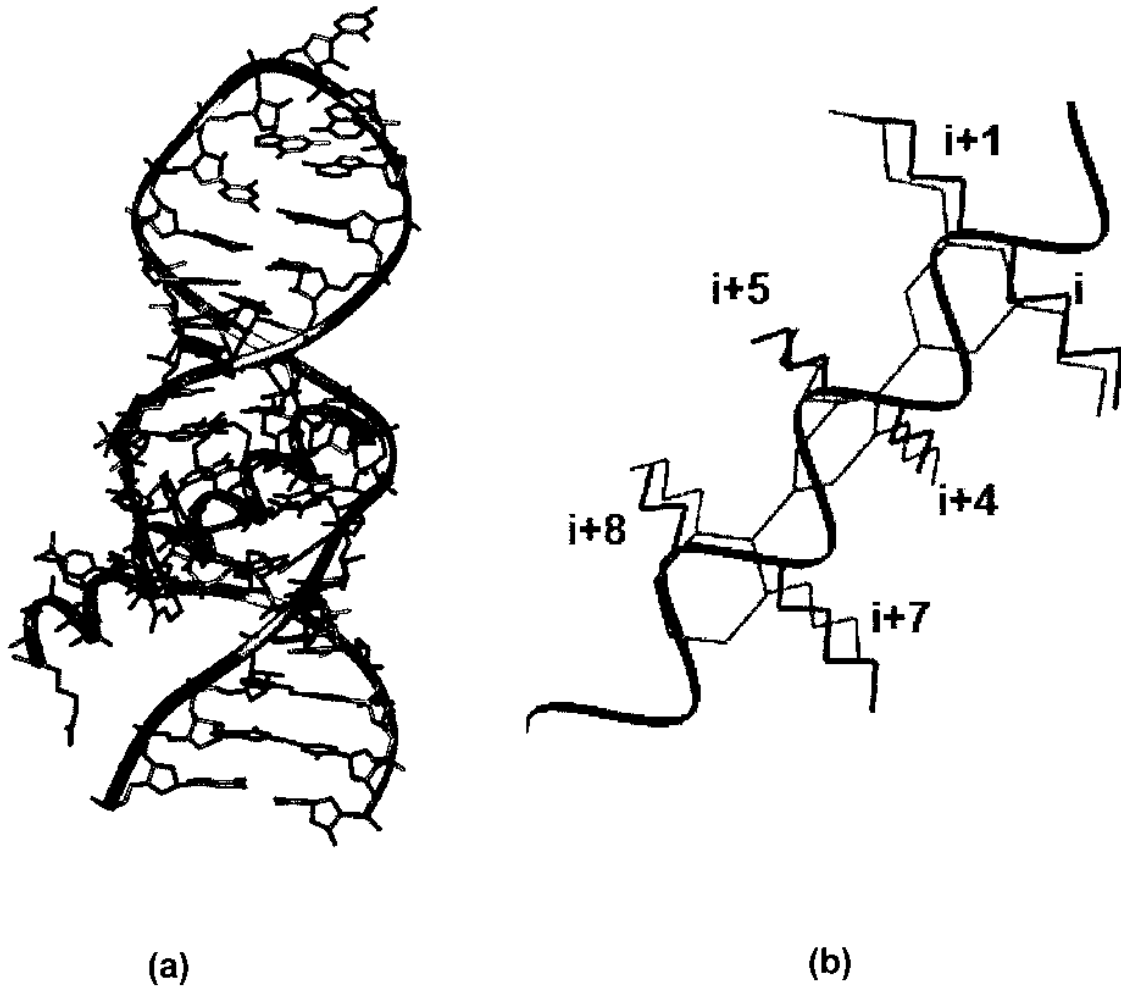
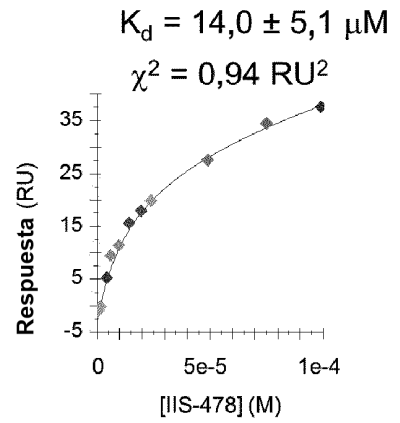
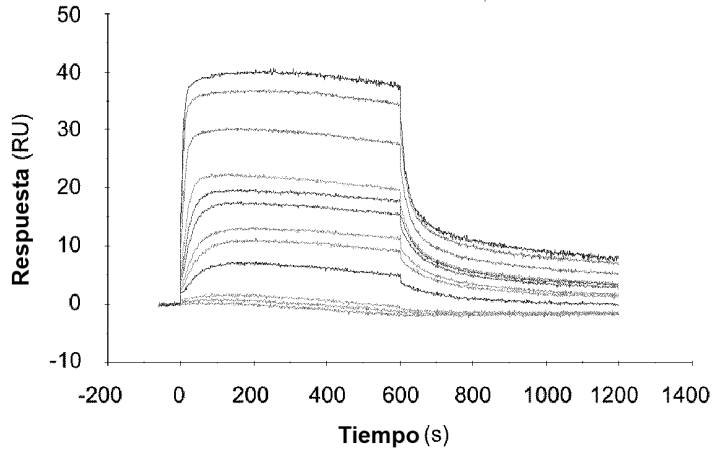
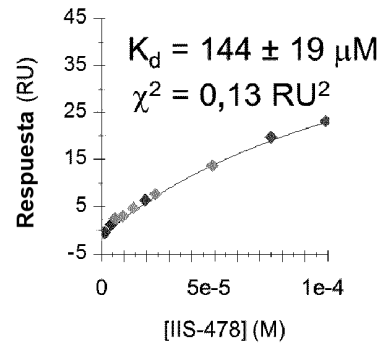
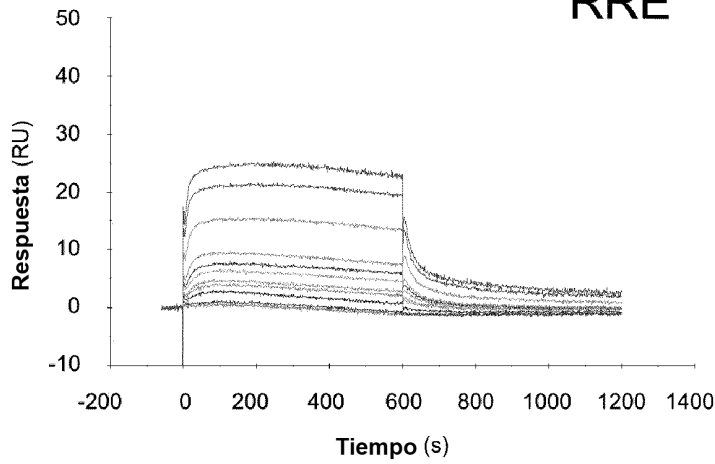


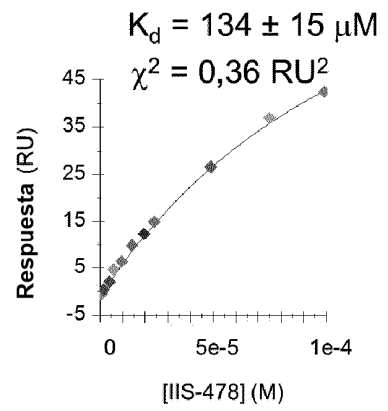
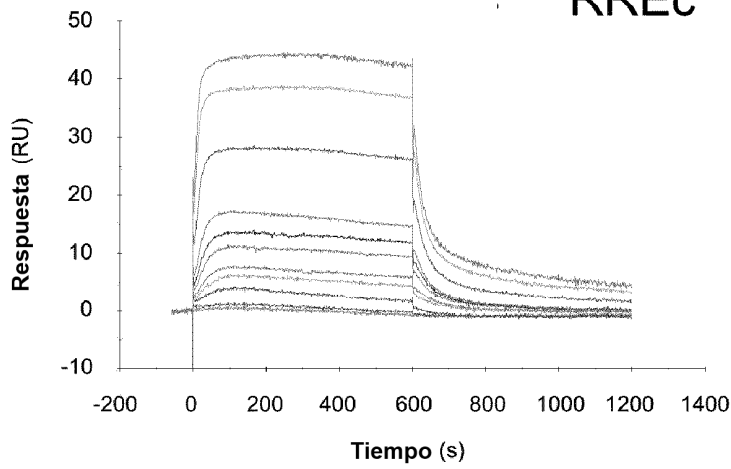
FIGURA 2



RRE

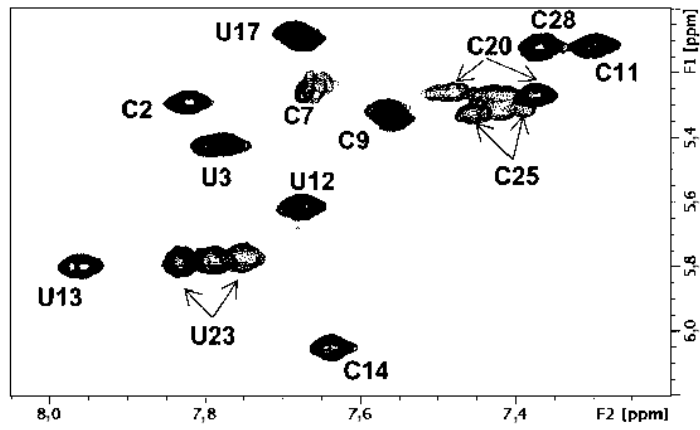


RREc

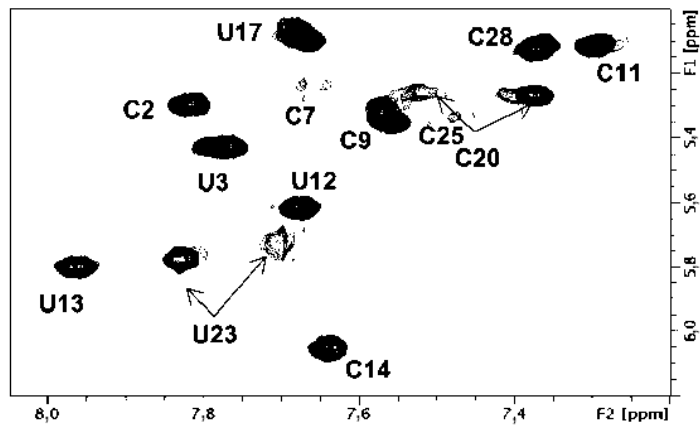


TARc

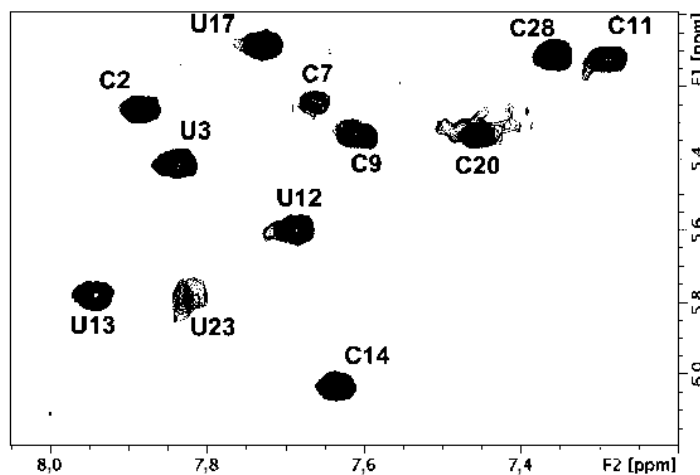
FIGURA 3



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

FIGURA 4

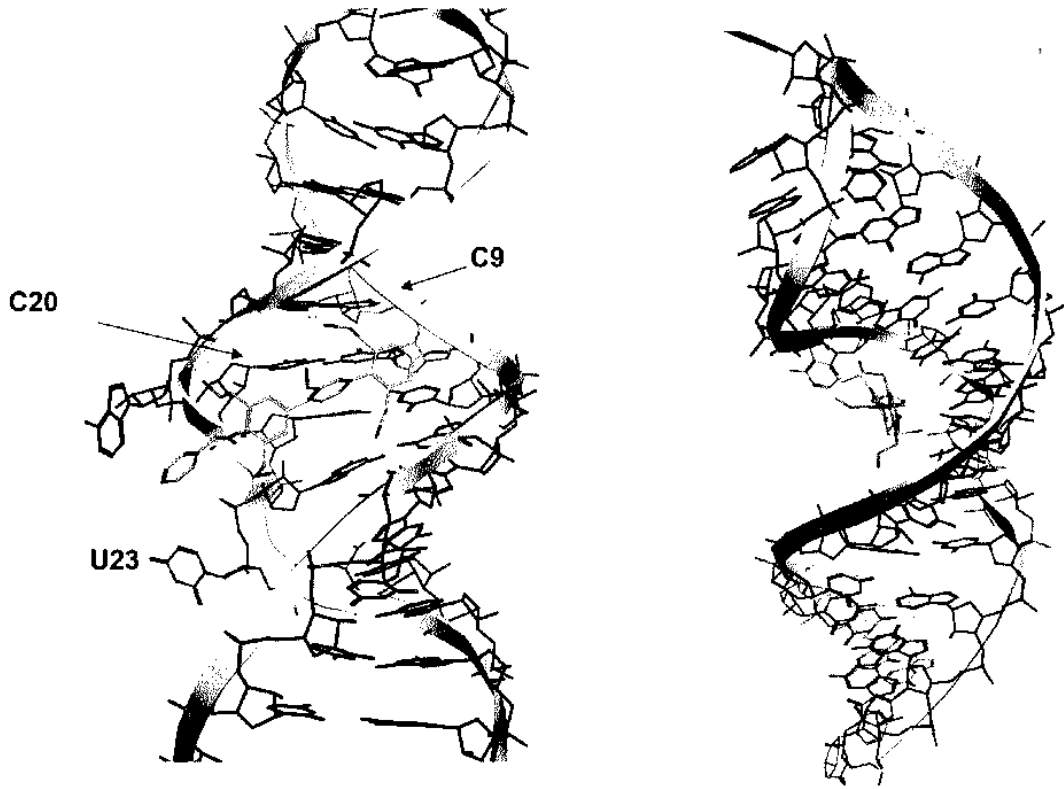


FIGURA 5

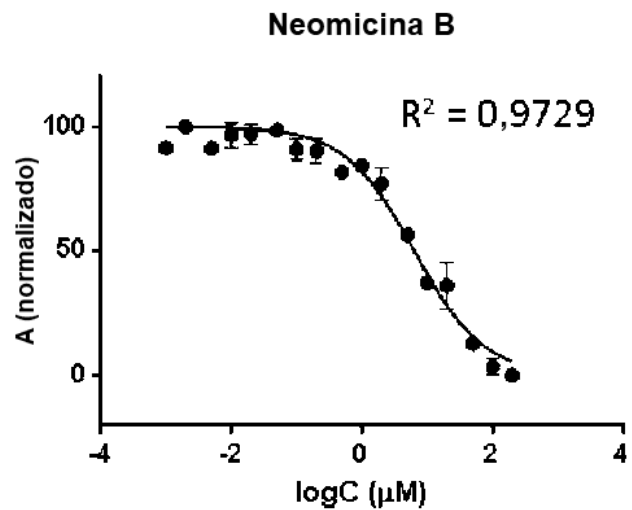
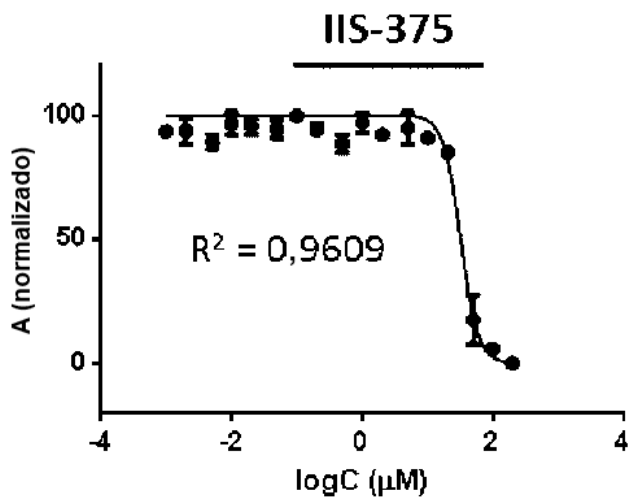
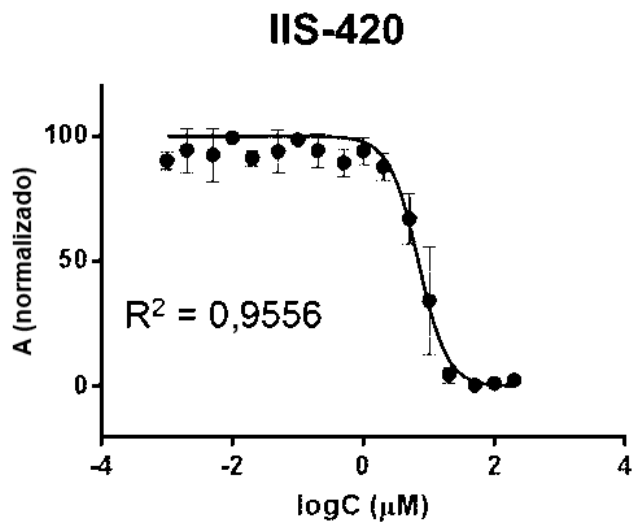


FIGURA 6a

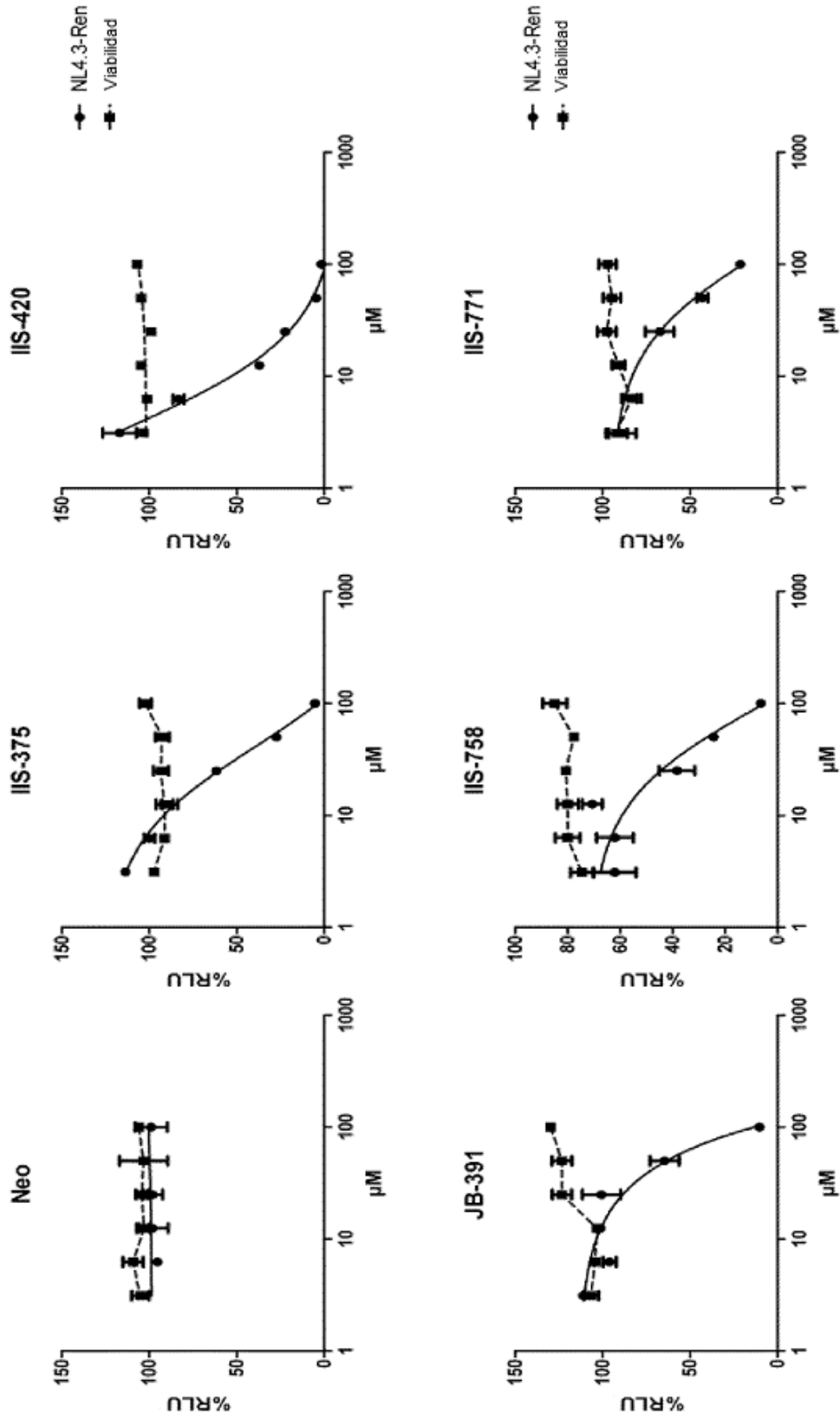
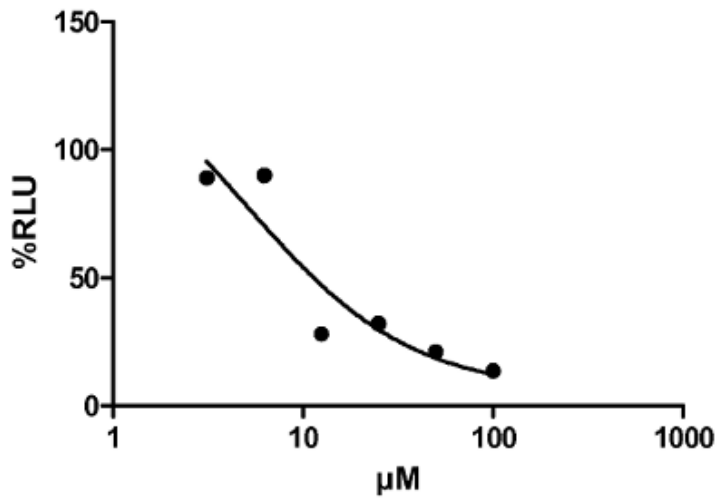
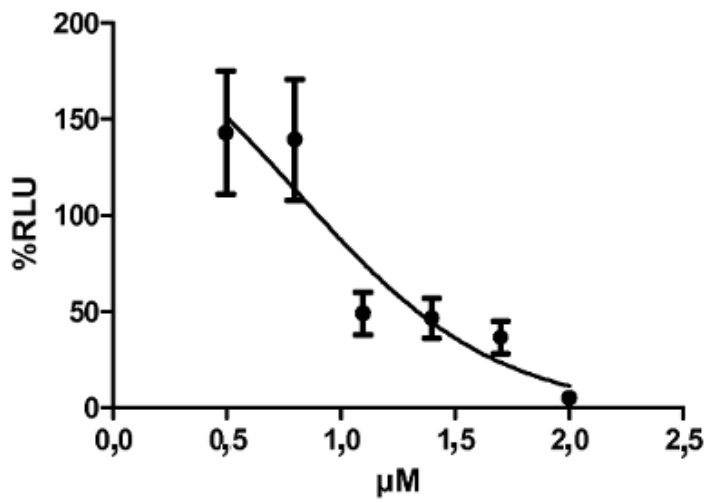


FIGURA 6b

IIS-420



IIS-375



IIS-758

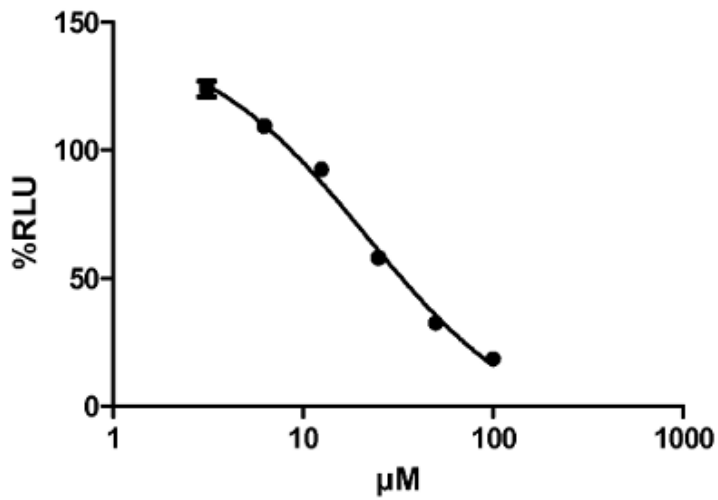


FIGURA 6c

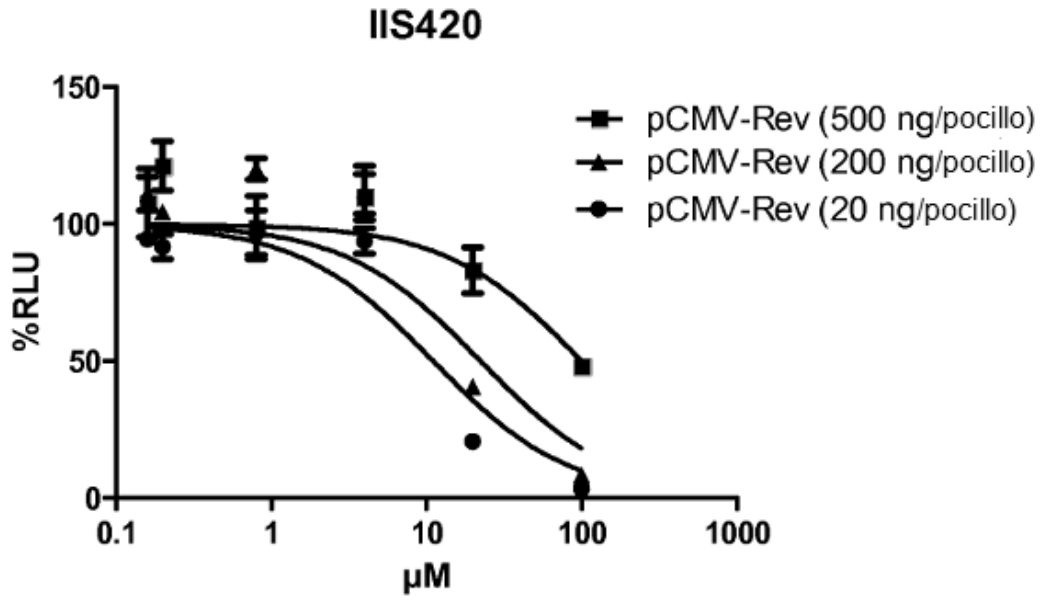


FIGURA 6d

