



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 771**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 5/12 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04759941 .0**

(96) Fecha de presentación : **16.04.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1629000**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

(54) Título: **Inhibidores peptídicos de isoquinolina macrocíclicos del virus de la Hepatitis C.**

(30) Prioridad: **16.04.2003 US 463423 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.05.2009

(73) Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
Route 206 and Provinceline Road
Princeton, New Jersey 08543-4000, US

(72) Inventor/es: **McPhee, Fiona;**
Campbell, Jeffrey Allen;
Li, Wenying;
D'Andrea, Stanley;
Zheng, Zhizhen Barbara;
Good, Andrew Charles;
Carini, David J.;
Johnson, Barry L.;
Scola, Paul Michael y
Boy, Kenneth, M.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Inhibidores peptídicos de isoquinolina macrocíclicos del virus de la Hepatitis C.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige generalmente a compuestos antivirales y más específicamente se dirige a compuestos que inhiben el funcionamiento de la proteasa NS3 (también denominada en este documento “serina proteasa”) codificada por el virus de la Hepatitis C (VHC), composiciones que comprenden tales compuestos y procedimientos para inhibir el funcionamiento de la proteasa NS3.

Antecedentes de la invención

El VHC es un patógeno humano grave, que infecta a aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo - aproximadamente 5 veces el número de infectados por el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1. Una fracción sustancial de estos individuos infectados con VHC desarrollan enfermedad hepática progresiva grave, que incluye cirrosis y carcinoma hepatocelular. (Lauer, G. M.; Walker, B. D. N. Engl. J. Med. (2001), 345, 41-52).

Actualmente, la terapia VHC más eficaz emplea una combinación de interferón-alfa y ribavirina, que conduce a una eficacia sostenida en el 40% de los pacientes. (Poynard, T. y col. Lancet (1998), 352, 1426-1432). Los resultados clínicos recientes demuestran que el interferón-alfa pegilado es mejor que el interferón-alfa no modificado como monoterapia (Zeuzem, S. y col. N. Engl. J. Med. (2000), 343, 1666-1672). Sin embargo, incluso con regímenes terapéuticos experimentales que implican combinaciones de interferón-alfa pegilado y ribavirina, una fracción sustancial de pacientes no tiene una reducción sostenida de la carga viral. Por tanto, existe una necesidad médica clara y no satisfecha de desarrollar medicamentos eficaces para el tratamiento de infección de VHC.

El VHC es un virus ARN de cadena positiva. En base a una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida y la similaridad exhaustiva en la región no traducida 5', se ha clasificado el VHC como un género separado en la familia Flaviviridae. Todos los miembros de la familia Flaviviridae tienen viriones envueltos que contienen un genoma ARN de cadena positiva que codifica todas las proteínas específicas de virus conocidas a través de la traducción de una única fase de lectura abierta ininterrumpida.

Se observa heterogenicidad considerable dentro de la secuencia nucleotídica y de aminoácidos codificados por todo el genoma de VHC. Se han caracterizado al menos 6 genotipos fundamentales y se han descrito más de 50 subtipos. Los genotipos fundamentales de VHC difieren en su distribución en todo el mundo y la significancia clínica de la heterogenicidad genética del VHC sigue siendo difícil de conseguir a pesar de los numerosos estudios de los efectos posibles de los genotipos en la patogénesis y la terapia.

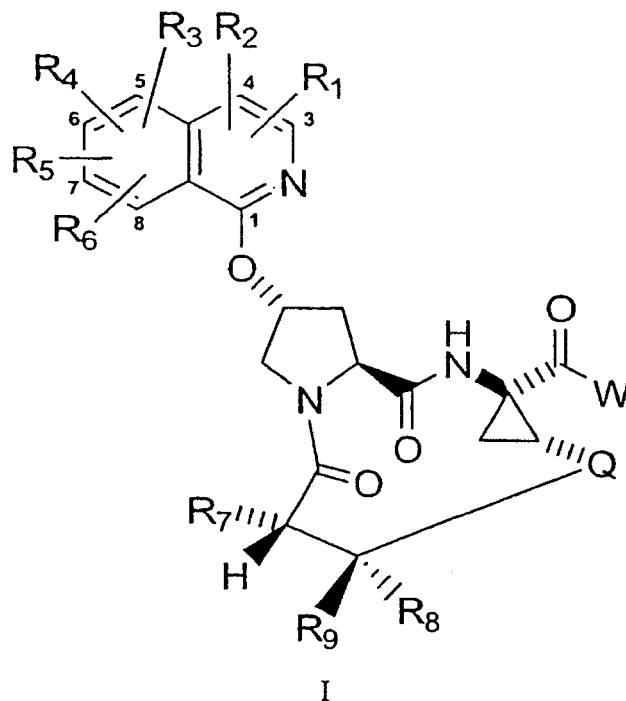
El genoma ARN de VHC de hélice única tiene una longitud de aproximadamente 9500 nucleótidos y tiene una fase de lectura abierta única (ORF) que codifica una poliproteína grande única de aproximadamente 3000 aminoácidos. En las células infectadas, las proteasas celulares y virales escinden esta poliproteína en múltiples sitios para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). En el caso del VHC, la generación de proteínas no estructurales maduras (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se logra mediante dos proteasas virales. La primera escinde en el punto de unión NS2-NS3; la segunda es una serina proteasa contenida dentro de la región N-terminal de NS3 y media todas las escisiones posteriores cadena debajo de NS3, tanto en *cis*, en el sitio de escisión NS3-NS4A, como en *trans*, para los sitios restantes NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. La proteína NS4A aparentemente sirve a múltiples funciones, actuando como un co-factor de la proteasa NS3 y posiblemente ayudando en la localización de membrana de NS3 y otros componentes de replicasa virales. La formación de complejo entre el dominio de proteasa NS3 y su cofactor, NS4A, es esencial para escisión proteolítica eficaz de los cuatro sitios respectivos. La proteína NS3 también muestra actividades de nucleósido trifosfatasa y helicasa de ARN. La NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que está implicada en la replicación de VHC.

Entre los compuestos que han demostrado eficacia en inhibir la replicación de VHC, como inhibidores de serina proteasa de VHC selectivos, están los compuestos peptídicos macrocíclicos descritos en la Solicitud Internacional PCT/CAOO/00353 (Nº de Publicación WO 00/59929).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos de isoquinolina macrocíclicos de la siguiente fórmula:

Un compuesto de fórmula I:



en la que:

- (a) R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} ; cicloalquilo C_{3-7} ; alcoxi C_{1-6} ; cicloalcoxi C_{3-7} ; halo-alcoxi C_{1-6} ; halo-alquilo C_{1-6} ; ciano; halo; hidroxilo; alcanóilo C_{1-6} ; nitro; amino; mono o di-alquil (C_{1-6})-amina; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amina; mono o di-alquil C_{1-6} -amida; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amida; carboxilo; carboxiéster (C_{1-6}); tiol; tioalquilo C_{1-6} ; alquilsulfóxido C_{1-6} ; alquil C_{1-6} -sulfona; alquil C_{1-6} -sulfonamida; arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C_{7-14} ; ariloxi C_{6-10} ; alquilariloxi C_{7-14} ; heteroariloxi monocíclico de 5-7 miembros; o Het; dichos R_1 a R_6 opcionalmente unidos al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C_{1-6} ;
- (b) R_7 es NH_2 o $-NR_{10}R_{11}$; donde R_{10} es alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , $C(O)-NR_{12}R_{13}$, $C(O)-OR_{14}$, $C(O)-SR_{15}$ o $-C(O)-R_{16}$; R_{11} es H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} , con la condición de que si R_{12} o R_{13} es H entonces R_{11} sea H;
- R_{12} y R_{13} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; o arilo; y donde R_{12} y R_{13} junto con el nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo de 4-7 miembros; R_{14} y R_{15} son cada uno independientemente alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; arilo o Het; R_{16} es H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; arilo o Het;
- (c) R_8 y R_9 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con halo, o alcoxi C_{1-3} , o haloalcoxi C_{1-3} ;
- (d) Q es una cadena C_{3-9} saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S(O_m); donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; $-C(O)-R_{18}$, $C(O)-OR_{19}$, $C(O)-NR_{20}R_{21}$ o $-SO_2R_{22}$; R_{18} , R_{20} y R_{21} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; R_{19} es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; R_{22} es arilo, alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; y

- (e) W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄; donde n es 1 ó 2, R₂₃ es alquilo C₁₋₈, alquilocicloalquilo C₄₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, ciano, amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amida o carboxilato; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het;

5

o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden los compuestos o sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de los mismos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En particular, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas útiles para inhibir la proteasa NS3 de HCV que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además el uso para la fabricación de un medicamento para tratar pacientes infectados con HCV, de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo. Además, la presente invención proporciona el uso para la preparación de un medicamento para inhibir la proteasa NS3 de HCV, de un compuesto de la presente invención.

En virtud de la presente invención, ahora es posible proporcionar fármacos mejorados que comprenden los compuestos de la invención que pueden ser eficaces en el tratamiento de pacientes infectados con HCV. Específicamente, la presente invención proporciona compuestos peptídicos que pueden inhibir el funcionamiento de la proteasa NS3, por ejemplo, junto con la proteasa NS4A. Además, la presente invención hace posible administrar una terapia de combinación a un paciente de manera que un compuesto de acuerdo con la presente invención, que es eficaz para inhibir la proteasa NS3 de HCV, puede administrarse con otro compuesto que tiene actividad anti-HCV, por ejemplo, un compuesto que es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre el grupo constituido por metaloproteasa de HCV, serina proteasa de HCV, polimerasa de HCV, helicasa de HCV, proteína NS4B de HCV, entrada de HCV, ensamblaje de HCV; salida de HCV, proteína NS5A de HCV, IMPDH y un análogo de nucleósido para el tratamiento de una infección por HCV.

30

Descripción detallada de la invención

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en este documento generalmente siguen el McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Book Company, Nueva York (1984) y Stereochemistry of Organic Compounds, Eliel, E. y Wilen, S., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994). Existen muchos compuestos orgánicos en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada en el plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para indicar el signo de rotación de luz polarizada en el plano por el compuesto, donde (-) o l significa que el compuesto es levorrotatorio y (+) o d significa que el compuesto es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos compuestos, denominados estereoisómeros, son idénticos, con la excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico de un par de imágenes especulares también puede referirse como enantiómero, y normalmente una mezcla de estos isómeros se denomina mezcla enantiomérica. Con respecto a los casos en los que se usa (R) o (S), esto se hace para indicar la configuración absoluta de un sustituyente en el contexto del compuesto entero y no en el contexto del sustituyente solo.

45

A menos que se indique específicamente otra cosa en este documento, los términos que se indican a continuación tienen las siguientes definiciones.

Las expresiones “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

50

El término “quiral” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no poder superponerse con el compañero de imagen especular, mientras que el término “aquiral” se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre su compañero de imagen especular.

55

El término “estereoisómeros” se refiere a compuestos que tienen una composición química idéntica, pero que difieren en la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

El término “diastereómero” se refiere a un estereoisómero que no es un enantiómero, por ejemplo, un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

65

El término “enantiómeros” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superimponibles entre sí.

ES 2 320 771 T3

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad total de cada componente activo que es suficiente para mostrar un beneficio valioso para el paciente, por ejemplo, una reducción sostenida en la carga viral. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, si se administran en combinación, en serie o de forma simultánea.

El término “compuestos de la invención”, y expresiones equivalentes, pretenden incluir compuestos de fórmula I, y sales enantioméricas y diastereoméricas farmacéuticamente aceptables, y solvatos, por ejemplo hidratos. De forma análoga, las referencias a intermedios pretenden incluir sus sales, y solvatos, donde el contexto lo permita. Las referencias al compuesto de la invención también incluyen los compuestos preferidos, por ejemplo, de fórmula II y A-M.

El término “derivado” se refiere a un compuesto modificado químicamente donde la modificación se considera rutinaria para los químicos especialistas, tal como un éster o una amida de un ácido, grupos protectores, tales como un grupo bencilo para un alcohol o tiol, y un grupo terc-butoxicarbonilo para una amina.

El término “solvato” se refiere a una asociación física de un compuesto de esta invención con una o más moléculas disolventes, orgánicas o inorgánicas. Esta asociación física incluye unión de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato podrá aislarse, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas disolventes en la estructura reticular cristalina del sólido cristalino. “Solvato” incluye solvatos de fase en solución e insolubles. Los solvatos ejemplares incluyen hidratos, etanolatos, metanolatos, isopropanolatos y similares.

El término “paciente” incluye un ser humano y otros mamíferos.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición que comprende un compuesto de la invención junto con al menos un soporte farmacéutico adicional, es decir, adyuvante, excipiente o vehículo, tal como diluyentes, agentes conservantes, cargas, agentes reguladores de flujo, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes de dispersión, dependiendo de la naturaleza de la vía de administración y de las formas de administración. Pueden usarse los ingredientes indicados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1999) por ejemplo.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en este documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones, por ejemplo, los compuestos y sus enantiómeros, diastereómeros, sales o solvatos, y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para el uso en contacto con los tejidos de pacientes para el tratamiento sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica excesivas, u otro problema o complicación en proporción a una relación riesgo/beneficio razonable.

El término “tratar” se refiere a: (i) prevenir la aparición de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección pero que aún no se ha diagnosticado que la tenga; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

El término “sustituido”, como se usa en este documento, incluye sustitución de uno al número máximo de sitios de unión posibles en el núcleo, por ejemplo, radical orgánico, al que está unido el sustituyente, por ejemplo, mono-, di-, tri- o tetra- sustituido, a menos que se indique específicamente otra cosa.

La nomenclatura usada para describir radicales orgánicos, por ejemplo, hidrocarburos e hidrocarburos sustituidos, sigue generalmente la nomenclatura convencional conocida en la técnica, a menos que se defina específicamente lo contrario. Las combinaciones de grupos, por ejemplo, alquilalcoxiamina o arilalquilo, incluyen todas las configuraciones estables posibles, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, un sustituyente alquilarilo puede unirse a un segmento del núcleo por la porción alquilo o la porción arilo del sustituyente alquilarilo, con la condición de que el compuesto resultante sea estable. Ciertos radicales y combinaciones se definen a continuación con fines de ilustración.

El término “halo”, como se usa en este documento, se refiere a un sustituyente halógeno seleccionado entre bromo, cloro, fluoro o yodo. El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más sustituyentes halo.

El término “alquilo”, como se usa en este documento, se refiere a sustituyentes hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada, acíclicos, que tienen el número especificado de átomos de carbono e incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo, hexilo, 1-metiletilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo. Por lo tanto, alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo alquilo que tiene de uno a seis átomos de carbono. El término “alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo que tiene de uno a seis, preferiblemente de uno a cuatro, átomos de carbono. El término “alquiléster” se refiere a un grupo alquilo que contiene adicionalmente un grupo éster. En general, un intervalo numérico de carbonos indicado, por ejemplo, alquiléster C₂₋₆, incluye todos los átomos de carbono en el radical.

ES 2 320 771 T3

El término “alqueno”, como se usa en este documento, se refiere a un radical alquilo que contiene al menos un doble enlace, por ejemplo, etenilo (vinilo) y alquilo.

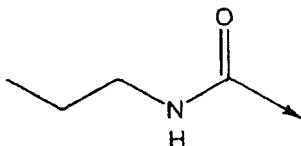
El término “alcoxi”, como se usa en este documento, se refiere a un grupo alquilo con el número indicado de átomos de carbono unido a un átomo de oxígeno. Alcoxi incluye, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, 1-metiletoxi, butoxi y 1,1-dimetil-etoxi. El último radical se denomina en la técnica terc-butoxi. El término “alcoxycarbonilo” se refiere a un grupo alcoxi que contiene adicionalmente un grupo carbonilo.

El término “cicloalquilo”, como se usa en este documento, se refiere a un sustituyente hidrocarbonado cíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y grupos espirocíclicos tales como espirociclopropilo y espirociclobutilo. El término “cicloalcoxi”, como se usa en este documento, se refiere a un grupo cicloalquilo unido a un átomo de oxígeno, tal como, por ejemplo, ciclobutiloxi o ciclopentiloxi. El término “alquilocicloalquilo” se refiere a un grupo cicloalquilo unido a un grupo alquilo. El intervalo numérico de carbonos indicado incluye el número total de carbonos en el radical, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, un alquil C₄₋₁₀-cicloalquilo puede contener 1-7 átomos de carbono en el grupo alquilo y 3-9 átomos de carbono en el anillo, por ejemplo, ciclopropilmetilo o ciclohexilmetilo.

El término “arilo”, como se usa en este documento, se refiere a un resto aromático que contiene el número indicado de átomos de carbono tal como fenilo, indanilo o naftilo. Por ejemplo, arilo C₆₋₁₀ se refiere a un resto aromático que tiene de seis a diez átomos de carbono que pueden estar en forma de una estructura monocíclica o bicíclica. El término “haloarilo”, como se usa en este documento, se refiere a un arilo mono, di o trisustituido con uno o más átomos de halógeno. Las expresiones “alquilarilo”, “arilalquilo” y “aralquilo” se refieren a un grupo arilo sustituido con uno o más grupos alquilo. A menos que se especifique el intervalo de carbonos de cada grupo, el intervalo indicado se aplica al sustituyente entero. Por lo tanto, un grupo alquil C₇₋₁₄-arilo puede tener 1-8 átomos de carbono en el grupo alquilo para un aromático monocíclico y 1-4 átomos de carbono en el grupo alquilo para un aromático condensado. La unión del grupo al sitio de unión en la molécula puede estar en el grupo arilo o el grupo alquilo. A menos que se especifique un radical arilo específico, por ejemplo, fluoro-fenilo, o se indique que el radical está sin sustituir, los radicales arilo, por ejemplo, en un sustituyente arilo o un sustituyente alquilarilo, incluyen los sustituidos con sustituyentes típicos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carbonilo, nitro, sulfo, amino, ciano, dialquilamino haloalquilo, CF₃, haloalcoxi, tioalquilo, alcanofilo, SH, alquilamino, alquilamida, dialquilamida, carboxiéster, alquilsulfona, alquilsulfonamida y alquil(alcoxi)amina. Los ejemplos de grupos alquilarilo incluyen bencilo, butilfenilo y 1-naftilmetilo.

El término “alcanofilo”, como se usa en este documento, se refiere a radicales 1-oxoalquilo lineales o ramificados que contienen el número indicado de átomos de carbono e incluyen, por ejemplo, formilo, acetilo, 1-oxopropilo (propionilo), 2-metil-1-oxopropilo, 1-oxohexilo y similares.

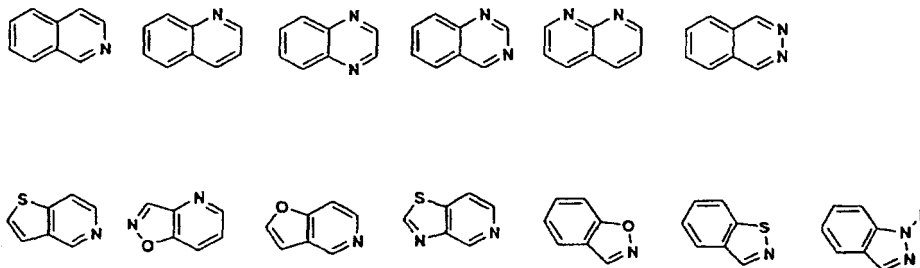
El término “alquilamida”, como se usa en este documento, se refiere a una amida mono-sustituida con un alquilo, tal como



El término “heterociclo”, también denominado “Het”, como se usa en este documento, se refiere a heterociclos bicíclicos de 7-12 miembros y heterociclos monocíclicos de 4-7 miembros.

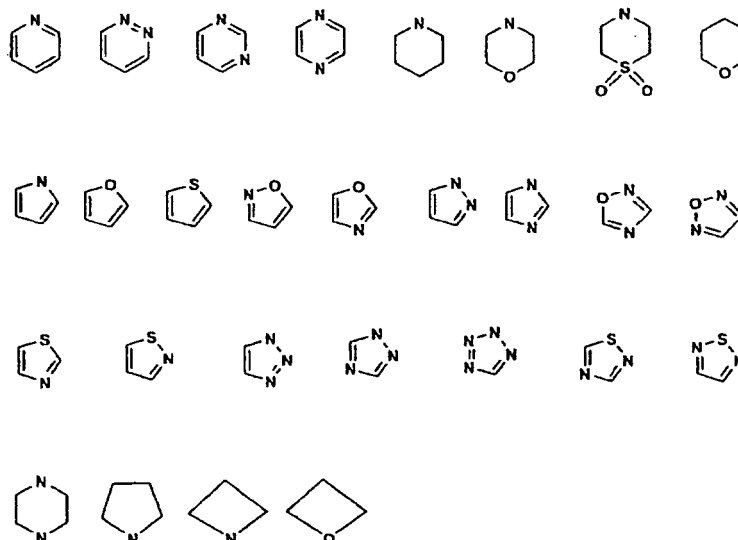
Los heterociclos bicíclicos preferidos son sistemas de anillos bicíclicos condensados de 7-12 miembros (ambos anillos comparten un par de átomos adyacentes) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, donde los dos anillos del heterociclo están totalmente insaturados. Los átomos que son heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados. El heterociclo bicíclico puede contener los heteroátomos en uno o los dos anillos. A menos que se especifique un heterociclo específico, por ejemplo, un heterociclo bicíclico fluorado de 7-12 miembros, o se indique que el heterociclo está sin sustituir, los heterociclos incluyen los que están sustituidos con sustituyentes típicos conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, el heterociclo bicíclico también puede contener sustituyentes sobre cualquiera de los átomos de carbono del anillo, por ejemplo, de uno a tres sustituyentes. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, alcoxi C₁₋₆, cicloalcoxi C₃₋₇, halo-alquilo C₁₋₆, CF₃, mono- o di-halo-alcoxi C₁₋₆, ciano, halo, tioalquilo, hidroxilo, alcanofilo, NO₂, SH, amino, alquilamino C₁₋₆, di-alquil (C₁₋₆)-amino, di-alquil (C₁₋₆)-amida, carboxilo, carboxiéster (C₁₋₆), alquil C₁₋₆-sulfona, alquil C₁₋₆-sulfonamida, alquil C₁₋₆-sulfóxido, di-alquil (C₁₋₆)-(alcoxi)amina, arilo C₆₋₁₀, alquilarilo C₇₋₁₄ y un heterociclo monocíclico de 4-7 miembros. Cuando dos sustituyentes están unidos a átomos de carbono vecinales del heterociclo bicíclico, pueden unirse para formar un anillo, por ejemplo, un sistema de anillos de cinco, seis o siete miembros, que contiene hasta dos heteroátomos seleccionados entre oxígeno y nitrógeno. El heterociclo bicíclico puede unirse a la molécula, por ejemplo, R₁ en la fórmula I, en cualquier átomo del anillo y preferiblemente carbono.

Los ejemplos de heterociclos bicíclicos incluyen los siguientes sistemas de anillos:



Los heterociclos monocíclicos preferidos son sistemas de anillos saturados, parcialmente saturados o totalmente insaturados de 4-7 miembros (este último subconjunto también se denomina en este documento heteroaromático insaturado) que contienen en el anillo de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, donde los heteroátomos de azufre y nitrógeno pueden estar opcionalmente oxidados. A menos que se especifique el heterociclo específico, por ejemplo, un heterociclo monocíclico de 4-7 miembros sustituido con alcoxi C_{1-6} , o se indique que el heterociclo está sin sustituir, los heterociclos incluyen los que están sustituidos con sustituyentes típicos conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, el heterociclo monocíclico puede contener sustituyentes en cualquiera de los átomos del anillo, por ejemplo, de uno a tres sustituyentes. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , alcoxi C_{1-6} , cicloalcoxi C_{3-7} , halo-alquilo C_{1-6} , CF_3 , mono- o di-halo-alcoxi C_{1-6} , ciano, halo, tioalquilo, hidroxilo, alcanofilo, NO_2 , SH, amino, alquilamino C_{1-6} , di-alquil (C_{1-6})-amino, di-alquil (C_{1-6})-amida, carboxilo, carboxiéster (C_{1-6}), alquil C_{1-6} -sulfona, alquil C_{1-6} -sulfóxido, alquil C_{1-6} -sulfonamida, di-alquil (C_{1-6})-(alcoxi)amina, arilo C_{6-10} , alquilarilo C_{7-14} y un heterociclo monocíclico de 4-7 miembros adicional. El heterociclo monocíclico puede unirse a la molécula, por ejemplo R_1 en la fórmula I, en cualquier átomo del anillo.

Los ejemplos de heterociclos monocíclicos incluyen los siguientes (y sus tautómeros):



Los especialistas en la técnica reconocerán que los heterociclos usados en los compuestos de la presente invención deben ser estables. En general, los compuestos estables son los que pueden sintetizarse, aislarse y formularse usando técnicas conocidas por los especialistas en la técnica sin degeneración del compuesto.

El término "sustituyente" con respecto a un aminoácido o derivado de aminoácido se refiere a un radical obtenido a partir del α -aminoácido correspondiente. Por ejemplo, los sustituyentes metilo, iso-propilo y fenilo representan los aminoácidos alanina, valina y fenilglicina, respectivamente.

Cuando se usan en el nombrado de compuestos de la presente invención, las designaciones "P1", "P1'", "P2", "P3" y "P4", como se usan en este documento, mapean las posiciones relativas de los restos de aminoácidos de un inhibidor de proteasa que se une de forma relativa a la unión del sustrato de escisión peptídica natural. La escisión se produce en el sustrato natural entre P1 y P1' donde las posiciones no primas designan aminoácidos partiendo del extremo terminal C del sitio de escisión peptídica natural que se extiende hacia el extremo N; mientras, las posiciones primas surgen del extremo terminal N de la designación del sitio de escisión y se extienden hacia el extremo C. Por ejemplo, P1' se refiere a la primera posición del extremo del lado derecho del extremo C del sitio de escisión (es decir, la posición del primer extremo N); mientras P1 parte de la numeración del lado izquierdo del sitio de escisión del extremo C,

10

15



25

30

35

- 40

45

- 50

55

- 60

65

- (e) W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄; donde n es 1 ó 2, R₂₃ es alquilo C₁₋₈, alquilcicloalquilo C₄₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, ciano, amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amida o carboxilato; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het;

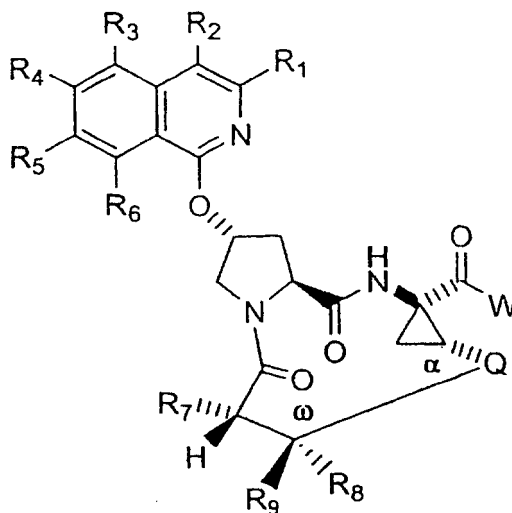
o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Preferiblemente, R₁ se une a la posición C₃ y se selecciona entre H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀ o Het. Preferiblemente, R₂, R₃, y R₄ se unen a las posiciones C₄, C₅ y C₆, respectivamente, y cada uno se selecciona independientemente entre H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀; o Het. Preferiblemente, R₅ y R₆ se unen a las posiciones C₇ y C₈, respectivamente, y cada uno se selecciona independientemente entre H; alquilo C₁₋₃; cicloalquilo C₃₋₄; alcoxi C₁₋₃; cicloalcoxi C₃₋₄; halo-alcoxi C₁₋₃; halo-alquilo C₁₋₃; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₃; mono o di-alquil (C₁₋₃)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amina; mono o di-alquil C₁₋₃-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amida; o carboxilo. Si se desea, uno o más de los sustituyentes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ puede unirse al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C₁₋₆, por ejemplo, un grupo metileno.

Preferiblemente, Q es una cadena C₃₋₉ saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S(O)_m; donde m es 0, 1 ó 2 o NR₁₇, donde R₁₇ es H; alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₁₋₆, -C(O)-R₁₈, C(O)-OR₁₉, C(O)-NR₂₀R₂₁ o -SO₂R₂₂. Preferiblemente, R₁₈, R₂₀ y R₂₁ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; R₁₉ es alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; y R₂₂ es arilo, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆, cada uno opcionalmente sustituido con halo.

Preferiblemente, W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄ donde n es 1 ó 2, R₂₃ es cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan compuestos de fórmula II:



II

en la que:

- (a) R₁ es H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀ o Het; dicho R₁ opcionalmente unido al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C₁₋₆; R₂, R₃ y R₄ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀; o Het; dichos R₂ a R₄ opcionalmente unidos al

grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C₁₋₃; R₅ y R₆ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₃; cicloalquilo C₃₋₄; alcoxi C₁₋₃; cicloalcoxi C₃₋₄; halo-alcoxi C₁₋₃; halo-alquilo C₁₋₃; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₃; mono o di-alquil (C₁₋₃)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amina; mono o di-alquil C₁₋₃-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amida; o carboxilo;

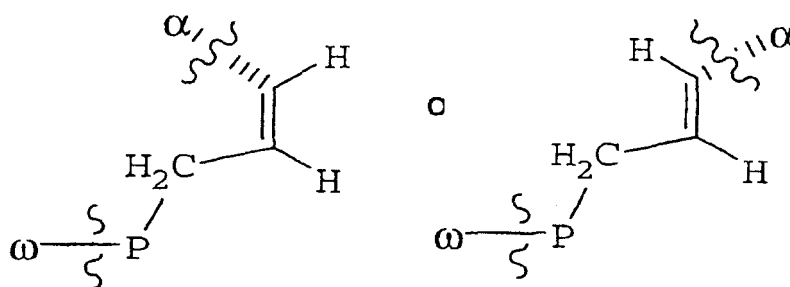
- (b) R₇ es NH₂ o -NR₁₀R₁₁; donde R₁₀ es alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, C(O)-NR₁₂R₁₃, C(O)-OR₁₄ o -C(O)-R₁₆; R₁₁ es H, alquilo C₁₋₆ o haloalquilo C₁₋₆, con la condición de que si R₁₂ o R₁₃ es H entonces R₁₁ sea H; R₁₂ y R₁₃ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o alquilcicloalquilo C₄₋₁₀, cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃, alquilo C₁₋₃ o haloalquilo C₁₋₃; y donde R₁₂ y R₁₃ junto con el nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo de 4-7 miembros; R₁₄ y R₁₅ son cada uno independientemente alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o alquilcicloalquilo C₄₋₁₀, cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃, alquilo C₁₋₃ o haloalquilo C₁₋₃; R₁₆ es H; alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o alquilcicloalquilo C₄₋₁₀, cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃, alquilo C₁₋₃ o haloalquilo C₁₋₃; arilo o Het;
- (c) R₈ y R₉ son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido con halo, o alcoxi C₁₋₃ o haloalcoxi C₁₋₃,
- (d) Q es una cadena C₃₋₉ saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S(O)_m; donde m es 0, 1 ó 2 o NR₁₇, donde R₁₇ es H; alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₁₋₆, -C(O)-R₁₈, C(O)-OR₁₉, C(O)-NR₂₀R₂₁ o -SO₂R₂₂; R₁₈, R₂₀ y R₂₁ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; R₁₉ es alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; R₂₂ es arilo, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆, cada uno opcionalmente sustituido con halo; y
- (e) W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄, donde n es 1 ó 2, R₂₃ es cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het;

o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Preferiblemente, R₁ es H; alcoxi C₁₋₃; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros; o arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros. Preferiblemente, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H; alcoxi C₁₋₆; halo-alcoxi C₁₋₆; hidroxilo; o mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina.

Preferiblemente, R₇ es NH₂ o -NHR₁₀; donde R₁₀ es C(O)-N R₁₂R₁₃ o C(O)-OR₁₄; y R₁₂ y R₁₃ son alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con halo; y R₁₄ es alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con halo.

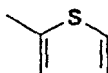
Preferiblemente, Q es una cadena de C₃₋₇ miembros que tiene un doble enlace que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O S(O)_m; donde m es 0, 1 ó 2 o NR₁₇, donde R₁₇ es H; alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆. En un aspecto preferido de la invención, Q tiene la siguiente estructura:



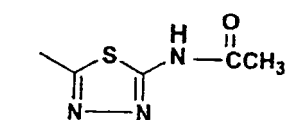
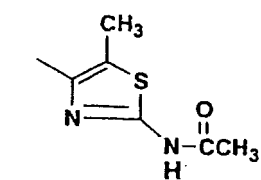
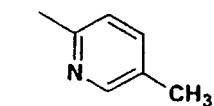
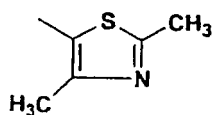
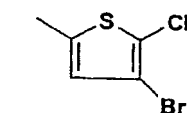
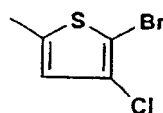
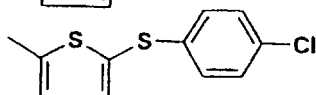
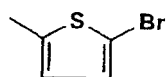
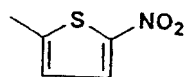
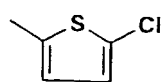
en la que P es una cadena saturada C₃ que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, S(O)_m; donde m es 0, 1 ó 2 o NR₁₇ (como se ha definido en el compuesto de Fórmula II).

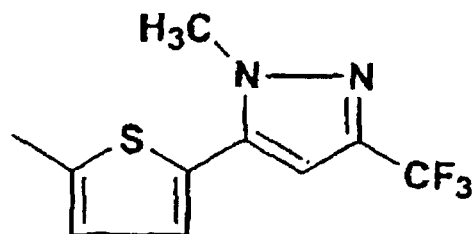
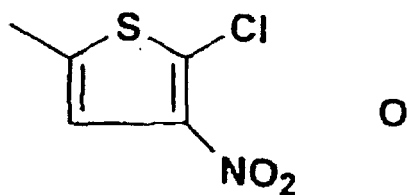
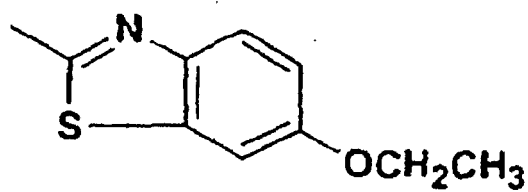
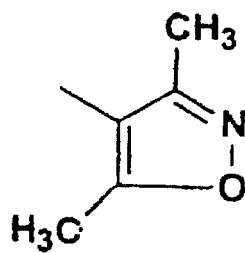
En un aspecto de la invención, W es preferiblemente -NH-SO_n-R₂₃, donde n es 1 ó 2 y R₂₃ es cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄. En otro aspecto de la invención, W es NH-SO_n-R₂₄, donde n es 1 ó 2 y R₂₄ es Het.

Preferiblemente, cuando R₂₄ es Het, el Het se selecciona entre el grupo constituido por:

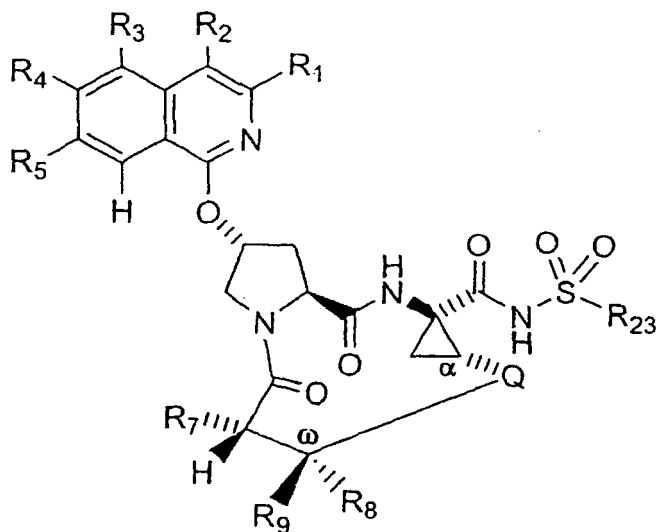


ES 2 320 771 T3





De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan compuestos de fórmula III:



III

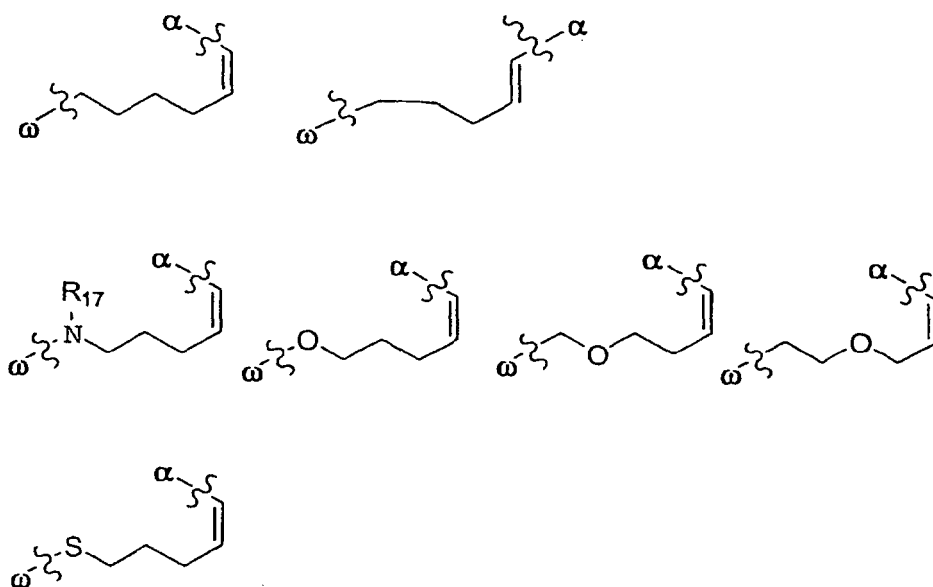
en la que:

- (a) R_1 es H; alcoxi C_{1-3} ; di-alquil (C_{1-6})-amina; un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros; o arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros;
- R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno independientemente H; alcoxi C_{1-3} ; halo; o di-alquil (C_{1-6})-amina;
- (b) R_7 es $-NHR_{10}$; donde R_{10} es $C(O)-NHR_{13}$ o $C(O)-OR_{14}$; R_{13} y R_{14} son alquilo C_{1-6} ;
- (c) Q es una cadena de C_{5-7} miembros que tiene un doble enlace que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} ; y
- (d) R_{23} es cicloalquilo C_{3-7} sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C_{7-9} -arilo o alquilo C_{1-4} ;

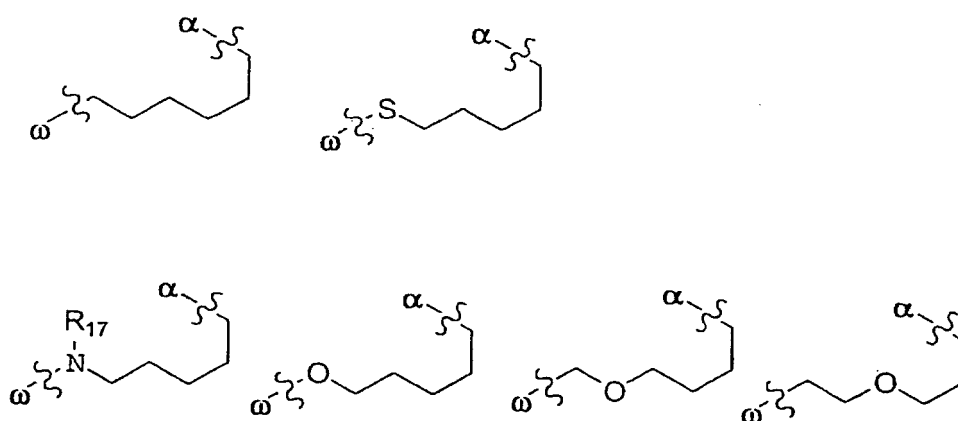
o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Preferiblemente, R_1 se selecciona entre el grupo constituido por piridina, pirrolidina, morfolina, piperazina, oxazol, isoxazol, tiazol, imidazol, pirrol y pirazol. En un aspecto preferido, R_1 es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más miembros seleccionados entre el grupo constituido por alcoxi C_{1-3} , halo, carboxilo, di-alquil (C_{1-3})-amina, haloalquilo C_{1-3} , trifluorometilo, trifluorometoxi e hidroxilo. En otro aspecto preferido, R_1 es piperazina sustituida con uno o más miembros seleccionados entre el grupo constituido por alquilo C_{1-3} , cicloalquilo C_{5-7} o piridina. Preferiblemente, R_2 es cloro o fluoro. En un aspecto preferido, R_2 es di-alquil (C_{1-3})-amina o metoxi.

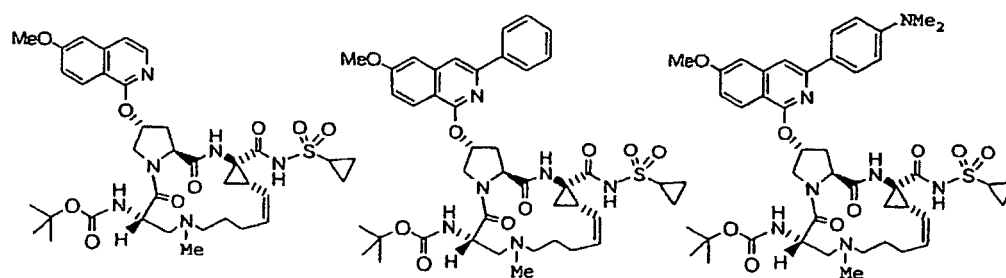
En un aspecto preferido, Q tiene una estructura seleccionada entre las siguientes:



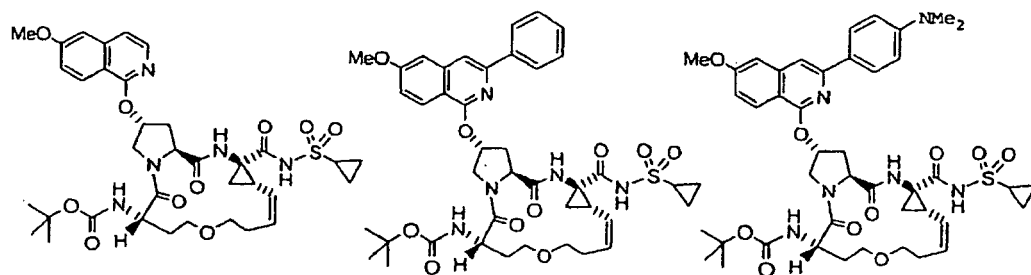
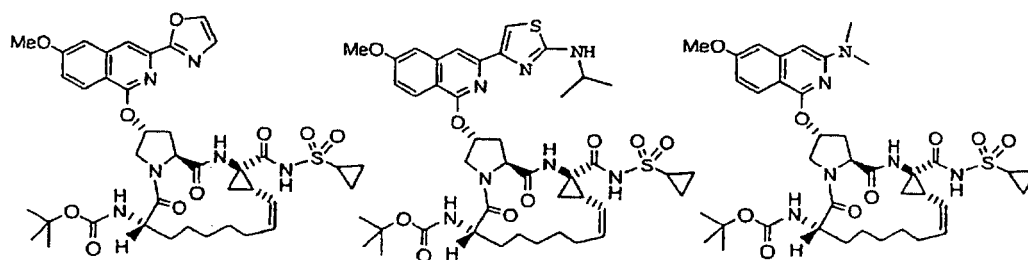
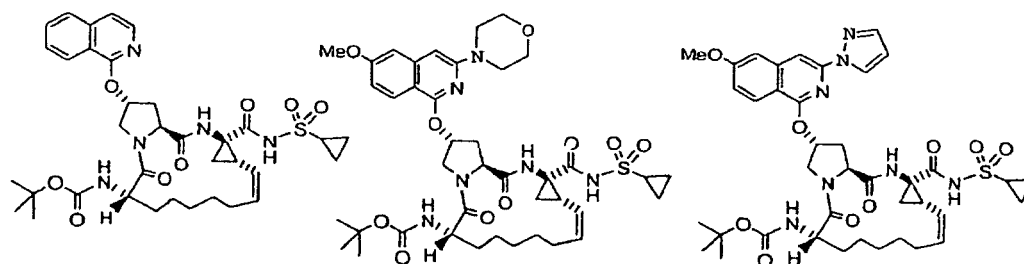
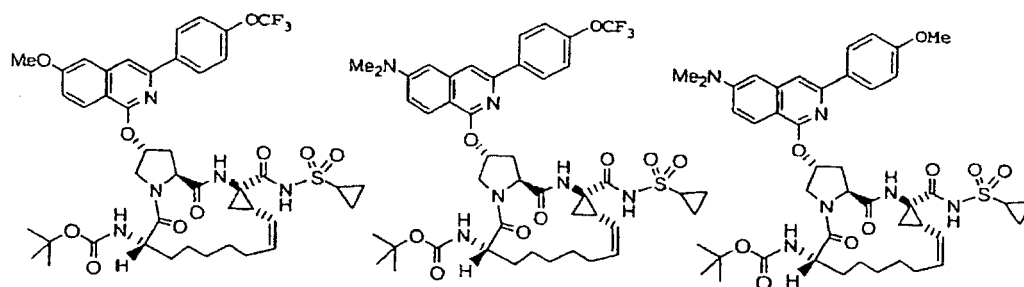
En otro aspecto preferido, Q tiene una estructura seleccionada entre las siguientes:

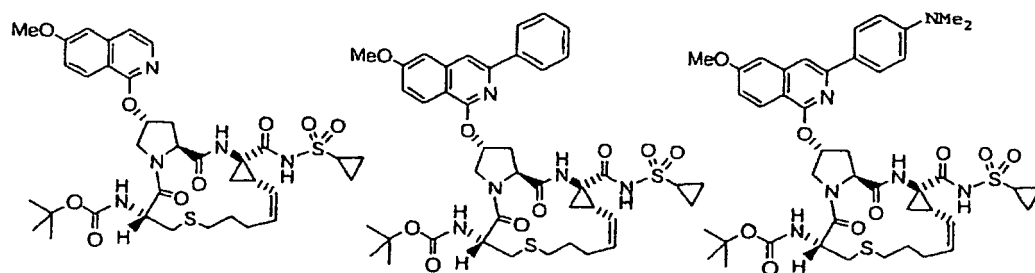
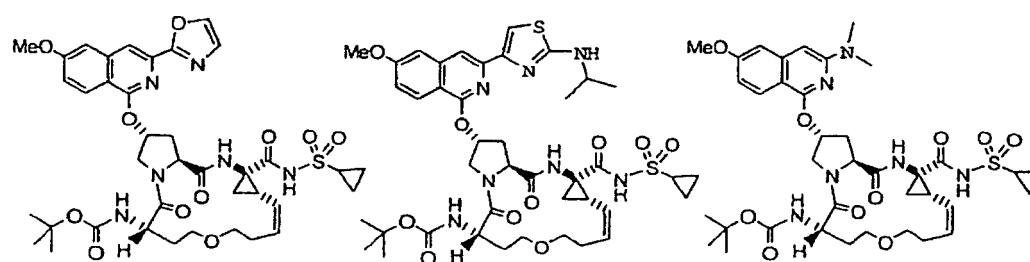
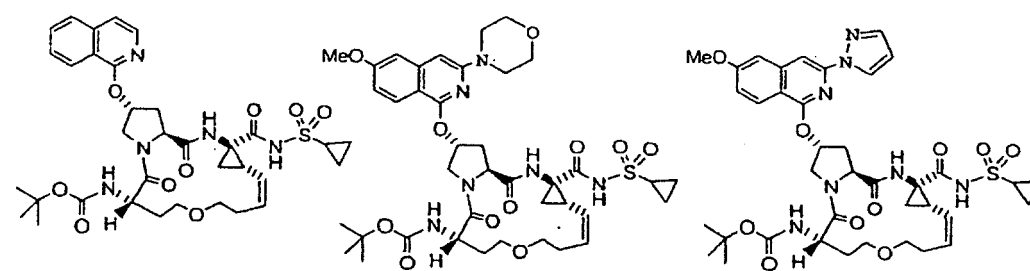
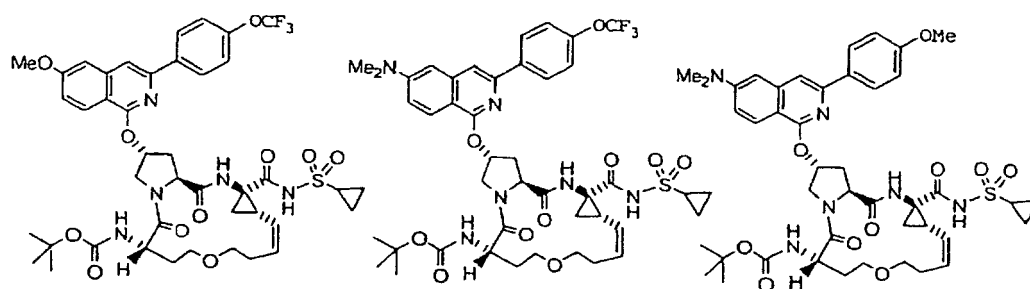


Los ejemplos de compuestos preferidos de acuerdo con la invención se seleccionan entre el grupo constituido por



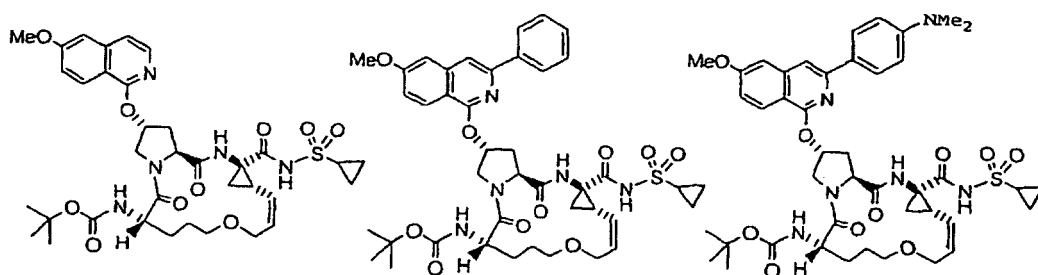
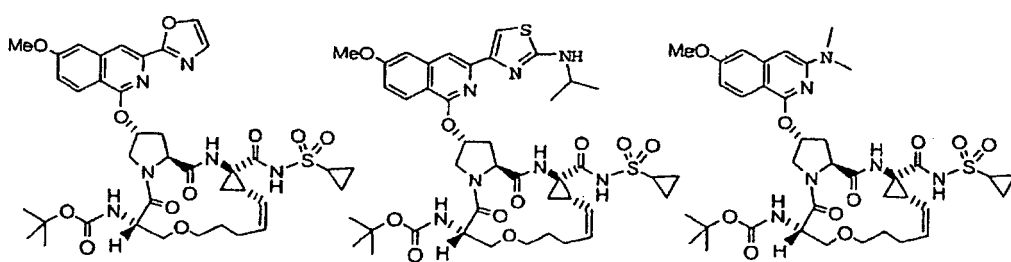
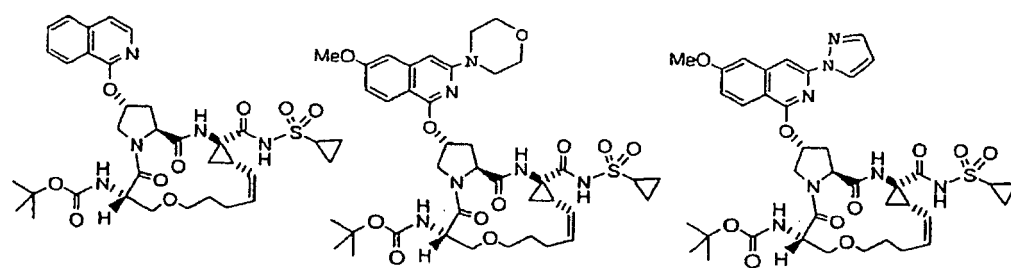
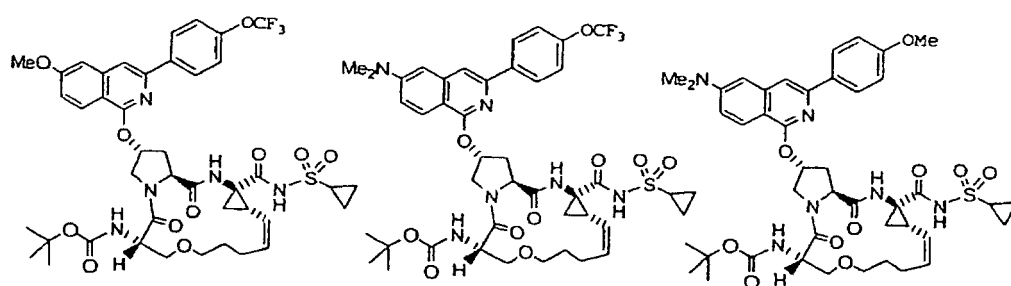


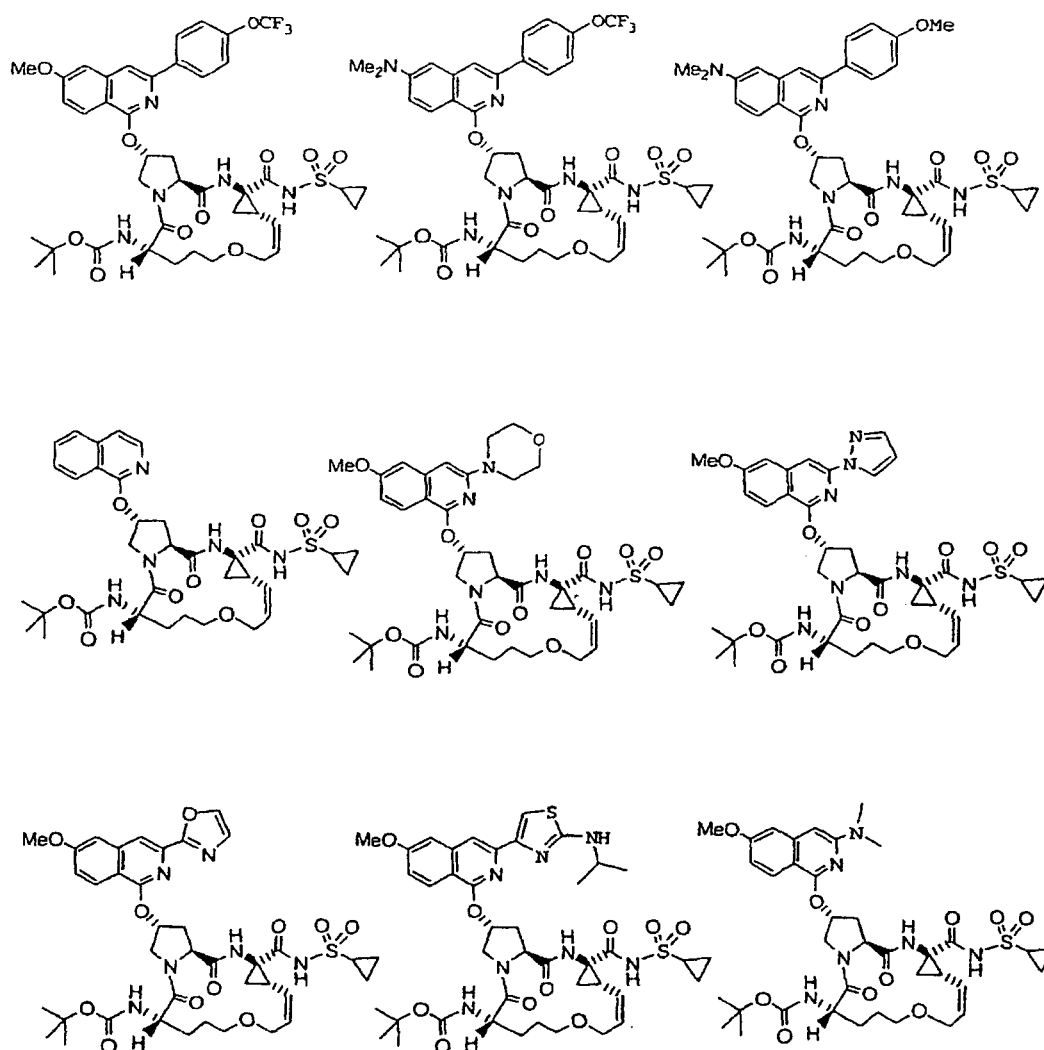






ES 2 320 771 T3





Los compuestos de la presente invención, que contienen un resto básico, pueden formar sales mediante la adición de un ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácidos se forman a partir de un compuesto de Fórmula I y un ácido inorgánico farmacéuticamente aceptable, incluyendo clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, fosfórico, o un ácido orgánico tal como *p*-toluenosulfónico, metanosulfónico, acético, benzoico, cítrico, malónico, fumárico, maleico, oxálico, succínico, sulfámico o tartárico. Por lo tanto, los ejemplos de dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, metanosulfonato, citrato, acetato, malonato, fumarato, sulfamato y tartrato.

Las sales de un grupo amina también pueden comprender sales de amonio cuaternario en las que el nitrógeno del amino tiene un grupo orgánico adecuado tal como un resto alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo.

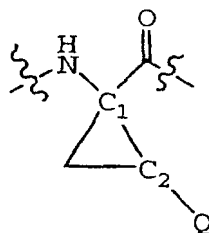
Los compuestos de la presente invención, que están sustituidos con un grupo ácido, pueden existir en forma de sales formadas a través de adición de bases. Dichas sales de adición de bases incluyen las obtenidas a partir de bases inorgánicas que incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio), sales de aluminio y sales de amonio. Además, las sales de adición de bases adecuadas incluyen sales de bases orgánicas fisiológicamente aceptables tales como trimetilamina, trietilamina, morfolina, piridina, piperidina, picolina, dicitlohexilamina, *N,N'*-dibenciletilendiamina, 2-hidroxiethylamina, bis-(2-hidroxiethyl)amina, tri-(2-hidroxiethyl)amina, procaína, dibencilpiperidina, *N*-bencil- β -fenetilamina, dehidroabietilamina, *N,N'*-bishidroabietilamina, glucamina, *N*-metilglucamina, colidina, quinina, quinolina, etilendiamina, ornitina, colina, *N,N'*-bencilfenetilamina, cloroprocaína, dietanolamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroxiethyl)aminometano e hidróxido de tetrametilamonio y aminoácidos básicos tales como lisina, arginina y *N*-metilglutamina. Estas sales pueden prepararse por procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

Listas de sales adecuadas se encuentran, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990, p. 1445.

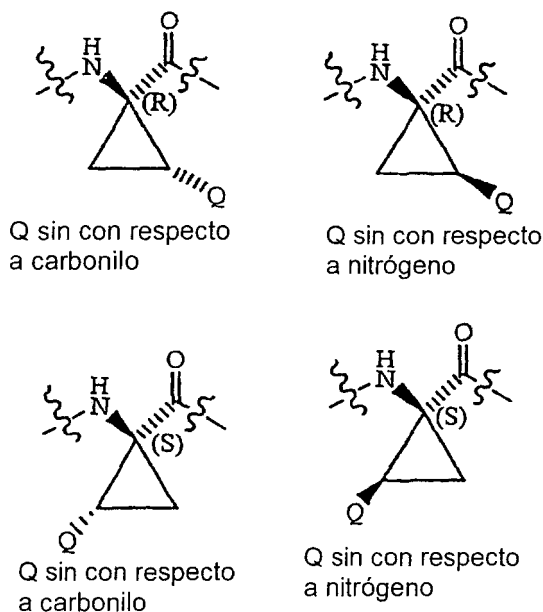
Ciertos compuestos de la presente invención, y sus sales, también pueden existir en forma de solvatos con agua, por ejemplo hidratos, o con disolventes orgánicos tales como metanol, etanol o acetonitrilo para formar, respectivamente, un metanolato, etanolato o acetonitrilato. La presente invención incluye cada solvato y mezclas de los mismos.

Además, los compuestos de la presente invención, o una sal o solvato de los mismos, pueden mostrar polimorfismo. La presente invención también incluye cualquiera de estas formas polimórficas.

Los compuestos de la presente invención (Fórmula I, II o III) también contienen dos o más centros quirales y existen en diferentes formas ópticamente activas. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula I pueden incluir un grupo ciclopropilo como se representa en el fragmento P1 a continuación:



en el que cada uno de C_1 y C_2 representa un átomo de carbono asimétrico en las posiciones 1 y 2 del anillo ciclopropilo. A pesar de otros centros asimétricos posibles en otros segmentos de los compuestos de la invención, la presencia de estos dos centros asimétricos significa que los compuestos pueden existir como mezclas de diastereómeros, tales como los diastereómeros de compuestos de Fórmula III en la que Q se configura syn con respecto a la amida o syn con respecto al carbonilo como se muestra a continuación.



La presente invención incluye enantiómeros y mezclas de enantiómeros de los compuestos, tales como mezclas racémicas.

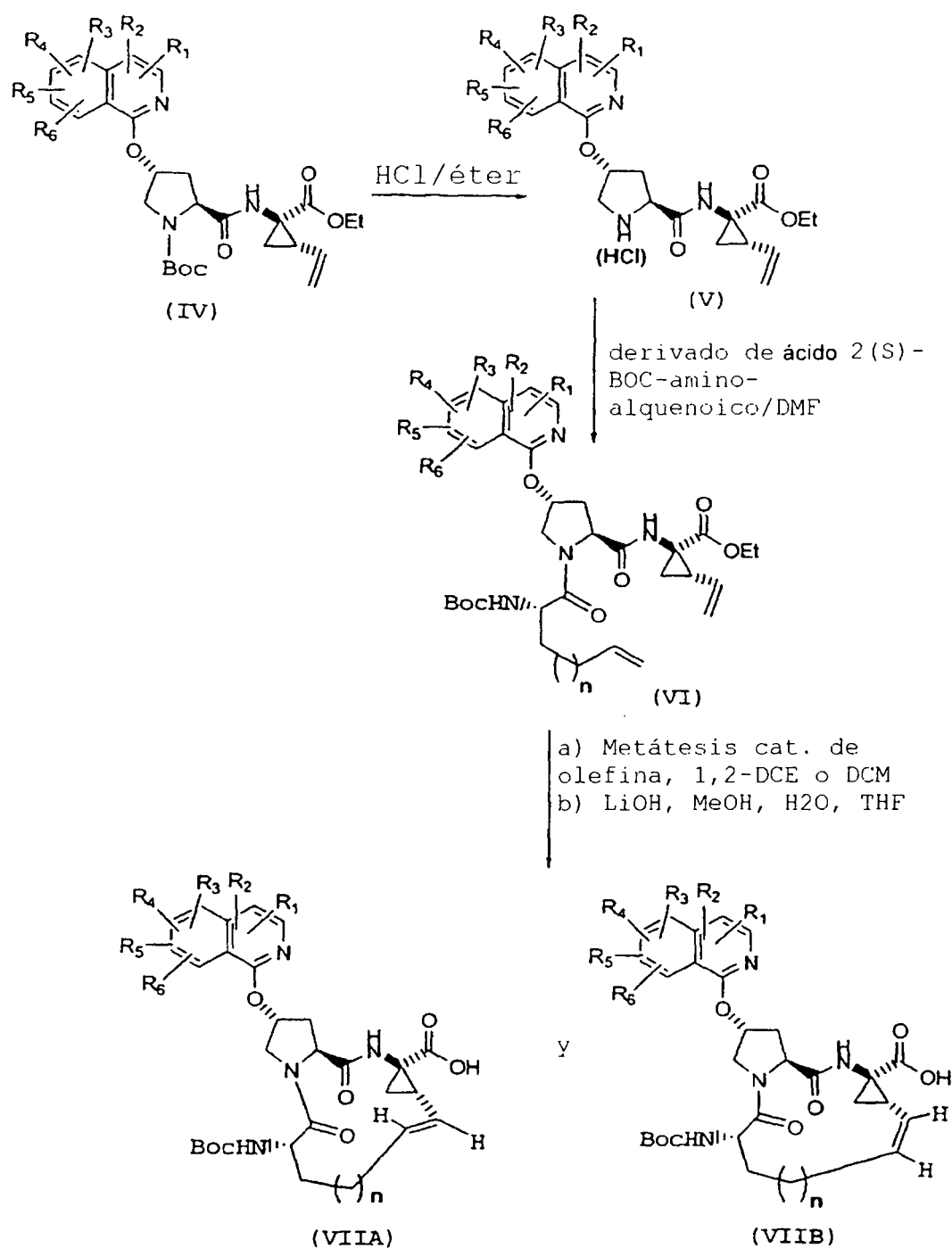
Los enantiómeros pueden resolverse por procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, por formación de sales diastereoisoméricas que pueden separarse por cristalización, cromatografía de gas-líquido o de líquidos, reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero. Se apreciará que cuando el enantiómero deseado se convierte en otra entidad química por una técnica de separación, entonces se requiere una etapa adicional para formar la forma enantiomérica deseada. Como alternativa, los enantiómeros específicos pueden sintetizarse por síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores o disolventes ópticamente activos, o convirtiendo un enantiómero en el otro por transformación asimétrica.

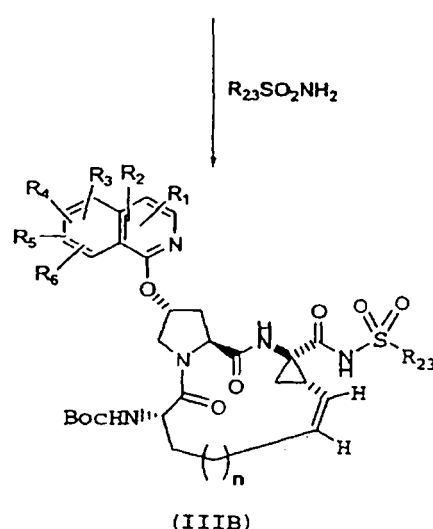
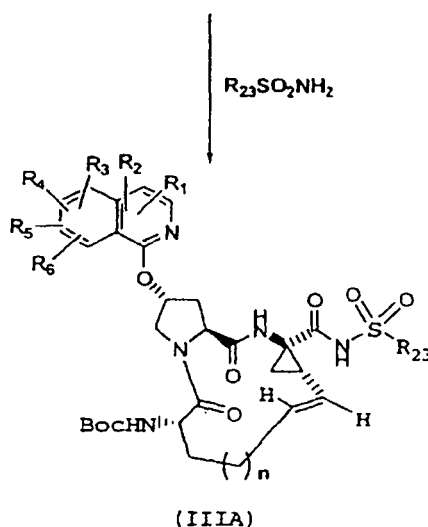
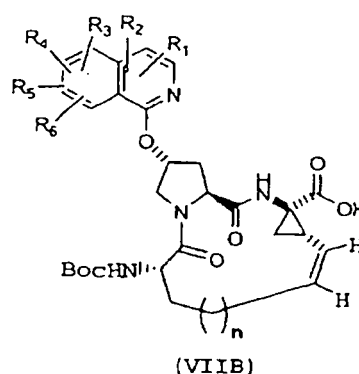
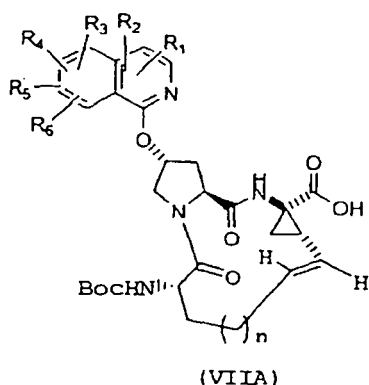
Ciertos compuestos de la presente invención también pueden existir en diferentes formas conformacionales que pueden ser separables. La asimetría torsional debida a la rotación restringida alrededor de un enlace sencillo asimétrico, por ejemplo debido a la obstaculización estérica o carga del anillo, puede permitir la separación de diferentes conformeros. La presente invención incluye cada isómero conformacional de estos compuestos y mezclas de los mismos.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en forma zwitteriónica y la presente invención incluye cada forma zwitteriónica de estos compuestos y mezclas de los mismos.

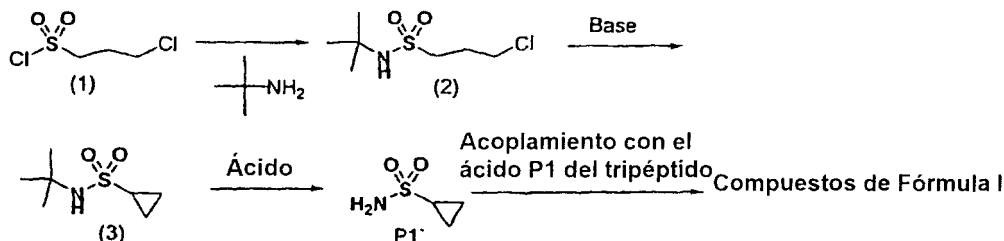
Los materiales de partida útiles para sintetizar los compuestos de la presente invención son conocidos por los especialistas en la técnica y pueden fabricarse fácilmente o están disponibles en el mercado.

Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse por procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención que tienen la estructura de Fórmula I, II o III pueden sintetizarse, como se muestra en el siguiente esquema, a partir de compuestos de Fórmula IV, Fórmula VIIA o VIIB. Se apreciará que puede preferirse o ser necesario preparar dicho compuesto en el que un grupo funcional se protege usando un grupo protector convencional para retirar después el grupo protector y proporcionar un compuesto de la presente invención. Los detalles referentes al uso de grupos protectores de acuerdo con la presente invención son conocidos por los especialistas en la técnica.



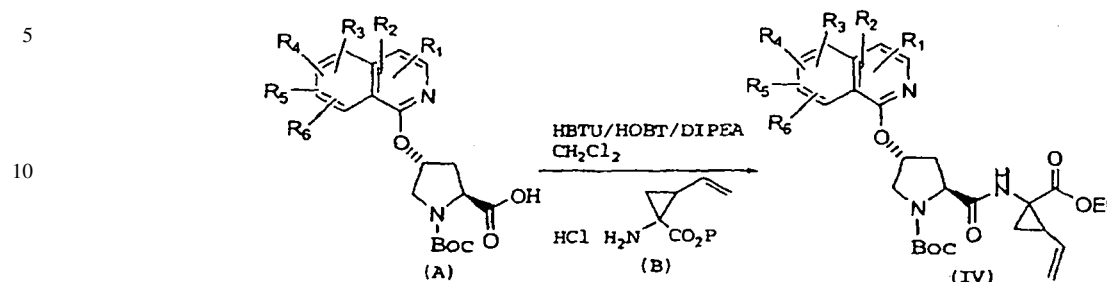


El ácido α -carboxílico de un compuesto de Fórmula VIIA o VIIB se acopla con $R_{23}SO_2NH_2$ (R_{23} como se ha definido anteriormente) en presencia de un agente de acoplamiento de péptidos, tal como CDI o EDAC, y en presencia de una base, tal como 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) y/o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), para formar un compuesto de Fórmula I, II o III. En la construcción de compuestos de Fórmula I, el extremo P1' se incorpora en las moléculas usando uno de los procedimientos generales indicados anteriormente y que se describen con más detalle a continuación. En algunos ejemplos, los elementos P1', que son las cicloalquilsulfonamidas, alquilsulfonamidas o heteroarilsulfonamidas, están disponibles en el mercado o pueden prepararse a partir del cloruro de alquil- o cicloalquil-sulfonilo correspondiente por tratamiento de dicho cloruro de sulfonilo con amoníaco. Como alternativa, estas sulfonamidas pueden sintetizarse usando el procedimiento general indicado en el siguiente Esquema. En él, el cloruro de 3-cloro-propilsulfonilo (1) disponible en el mercado se convierte en una sulfonamida protegida adecuada, por ejemplo, por tratamiento con terc-butil amina. Después, la sulfonamida obtenida (2) se convierte en la cicloalquilsulfonamida correspondiente por tratamiento con dos equivalentes de una base tal como butil litio en un disolvente tal como THF a baja temperatura. La cicloalquilsulfonamida resultante puede desprotegerse por tratamiento con un ácido para proporcionar la cicloalquilsulfonamida desprotegida deseada. Dicho fragmento P1' puede incorporarse en compuestos de Fórmula I.

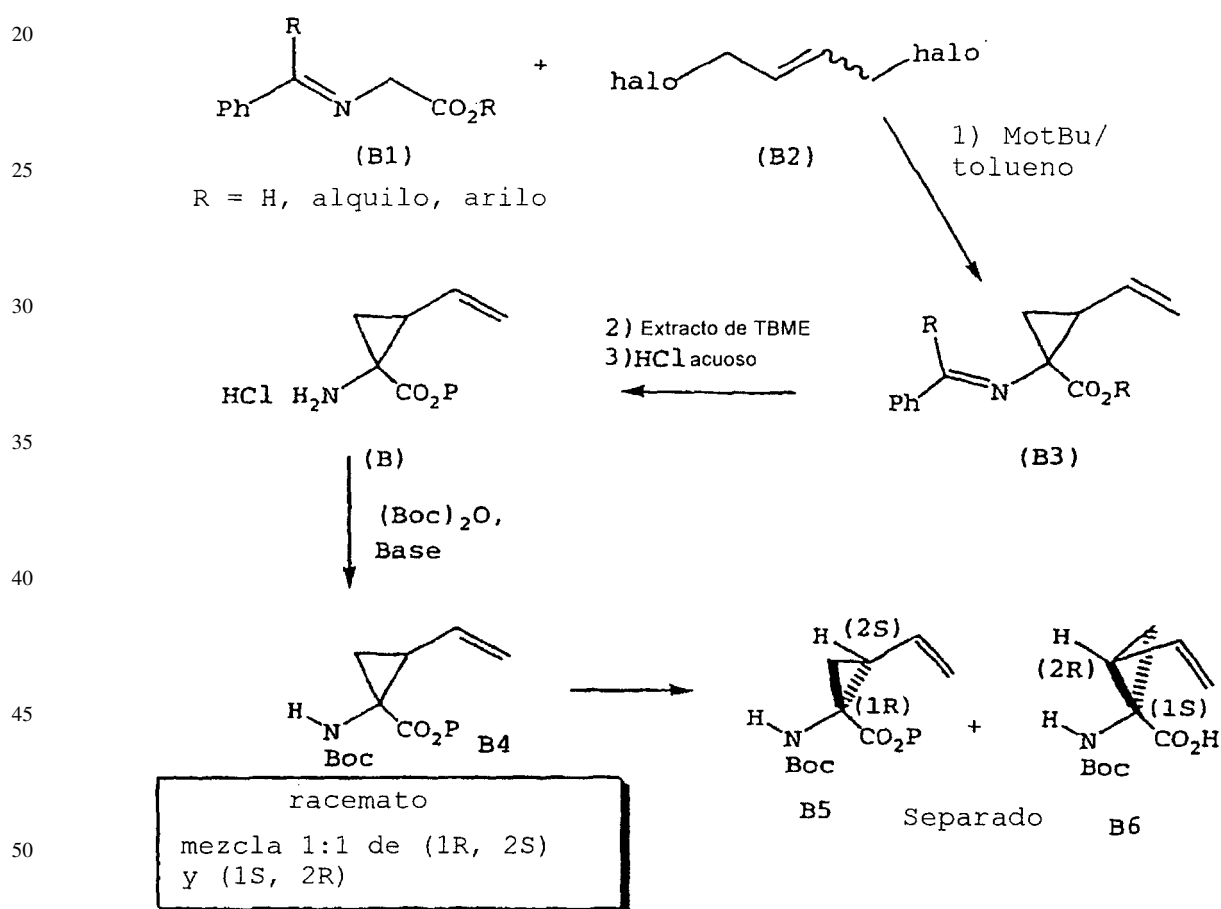


Los compuestos que tienen la estructura de Fórmula IV, VI, VIIA o VIIB pueden prepararse, por ejemplo, como se describe en este documento, y en la Solicitud Internacional Número PCT/US01/45145, Publicación N° WO 02/060926, publicada el 8 de agosto de 2002; Solicitud Internacional Número PCT/CA00/00353, Publicación N° WO 00/59929, publicada el 12 de octubre de 2000; y Patente de Estados Unidos 6.323.180 concedida el 27 de noviembre de 2001.

Los compuestos que tienen la estructura de Fórmula IV también pueden prepararse acoplando el precursor químico A con el precursor químico B como se muestra a continuación.



El precursor químico B, que también se ha mostrado anteriormente, puede sintetizarse, por ejemplo, como se indica a continuación.

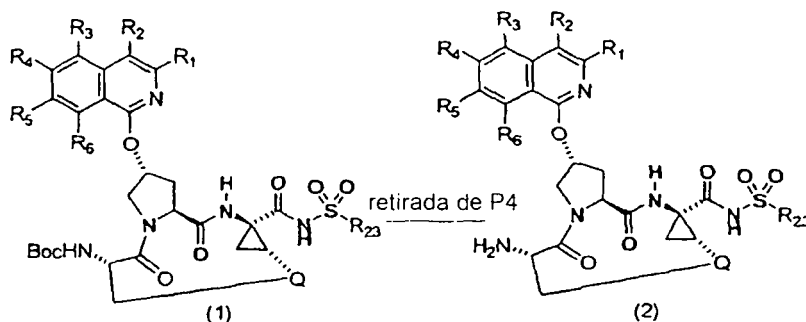


55 El tratamiento de la imina (B1) disponible en el mercado o fácilmente sintetizable con 1,4-dihalobuteno (B2) en presencia de una base proporciona la imina (B3). La hidrólisis ácida de B3 proporciona después B, que tiene un sustituyente de vinilo syn con respecto al grupo carboxilo. Se prefiere que para los compuestos B3 y B el grupo vinilo sea syn con respecto al éster. El resto amina de B puede protegerse usando un grupo Boc para proporcionar el aminoácido totalmente protegido B4. Este intermedio es un racemato que puede resolverse por un proceso enzimático en el que el resto éster de B4 se escinde para proporcionar el ácido carboxílico correspondiente. Sin unirse a ninguna

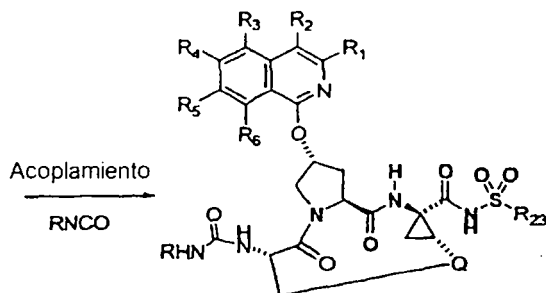
60 teoría particular, se cree que esta reacción es selectiva en que uno de los enantiómeros B4 (1S, 2R) experimenta la reacción a una velocidad mucho mayor que su imagen especular B4 (1R, 2S) proporcionando una resolución cinética del racemato intermedio. En el ejemplo citado anteriormente, el estereoisómero más preferido para la integración en los tripéptidos es B4 (1R, 2S). En presencia de la enzima, este enantiómero no experimenta escisión del éster y por lo tanto este enantiómero B5 se recupera de la mezcla de reacción. Sin embargo, el enantiómero menos preferido B4 (1S, 2R) experimenta escisión del éster, es decir, hidrólisis catalizada con enzimas, para proporcionar el ácido libre B6. El éster (B5) puede separarse del producto ácido (B6) por procedimientos convencionales tales como, por ejemplo,

65 procedimientos de extracción acuosa o cromatografía.

Los compuestos de Fórmula 1 también pueden convertirse en otros compuestos de Fórmula I como se describe en este documento. Un ejemplo de dicho procedimiento es el Esquema que se muestra a continuación, en el que un compuesto de Fórmula I(1) que tiene un grupo Boc en la posición P4 se convierte en un compuesto de Fórmula I (3) en el que dicho compuesto tiene un grupo urea en la posición P4. La conversión de (1) en (3) puede realizarse en un procedimiento de dos etapas, la primera de las cuales es la conversión de (1) en la amina (2) por tratamiento de (1) con un ácido tal como TFA en un disolvente tal como cloruro de metileno. La sal TFA de amina resultante puede tratarse con un isocianato en presencia de un equivalente de base para proporcionar un compuesto de Fórmula I (3) en la que el resto P3 se tapa con una urea. Como se ha indicado previamente, un especialista en la técnica reconocerá que el intermedio (2) puede usarse como material de partida para la preparación de compuestos de Fórmula I en la que el grupo P3 se tapa con una amida o un carbamato. La construcción de dichos compuestos de Fórmula I puede conseguirse usando condiciones convencionales para la formación de dichas funcionalidades P4 a partir de aminas.

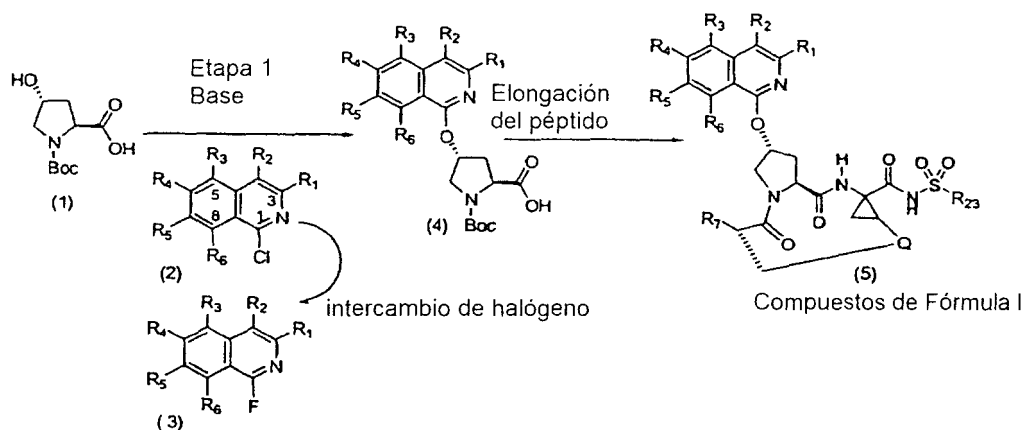


Compuestos de fórmula I



Compuestos de Fórmula I (3)

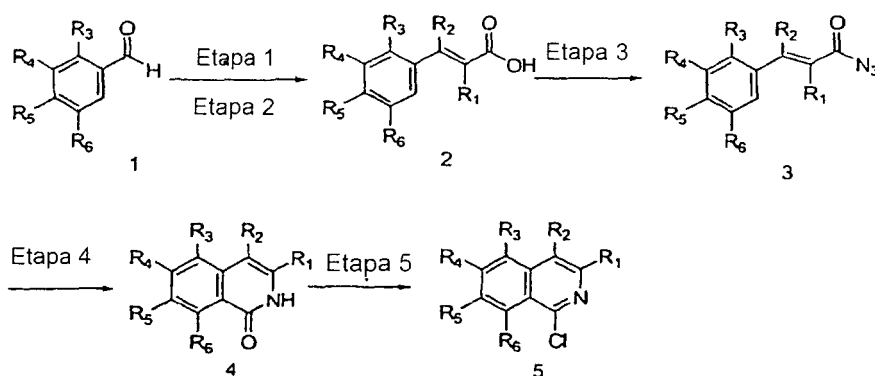
Los procedimientos para preparar intermedios P2 y compuestos de Fórmula I se muestran en los siguientes Esquemas. Debe apreciarse que en muchos casos las reacciones se representan para una sola posición de un intermedio. Sin embargo, debe entenderse que dichas reacciones pueden usarse para otorgar modificaciones a otras posiciones dentro de este intermedio. Además, dichos intermedios, condiciones de reacción y procedimientos dados en los ejemplos específicos pueden aplicarse ampliamente a compuestos con otros patrones de sustitución. Los Esquemas generales que se muestran a continuación se siguen de los ejemplos de este documento. Los ejemplos generales y sintéticos no son limitantes.



Compuestos de Fórmula I

El Esquema anterior muestra el acoplamiento de un resto C4-hidroxiprolina N-protégido con un heterociclo de isoquinolina para formar el intermedio (4) y la posterior modificación de dicho intermedio (4) para dar un compuesto de Fórmula I por el procedimiento de elongación de péptido y una reacción de metátesis de olefina con cierre del anillo como se describe en este documento. Debe apreciarse que en la primera etapa, que es el acoplamiento del grupo C4-hidroxi prolina con el elemento de isoquinolina, se emplea una base. Un especialista en la técnica reconocerá que este acoplamiento puede realizarse usando bases tales como terc-butóxido potásico o hidruro sódico, en un disolvente tal como DMF o DMSO o THF. Este acoplamiento con el sistema de anillos de isoquinolina se produce en la posición C1 (numeración para el sistema de anillos de isoquinolina mostrada en el intermedio 2) y se dirige por el grupo cloro que se desplaza en este procedimiento. Debe apreciarse que pueden utilizarse grupos salientes alternativos en esta posición tales como un fluoro como se muestra en el Esquema. Dichos intermedios de fluoro (3) están disponibles a partir del compuesto de cloro correspondiente usando procedimientos bibliográficos descritos en este documento.

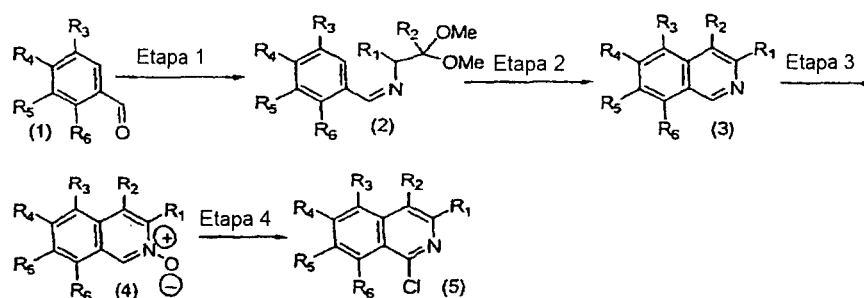
En un subconjunto de ejemplos de este documento, se incorporan isoquinolinas en los compuestos finales y específicamente en la región P2 de dichos compuestos. Un especialista en la técnica reconocerá que están disponibles varios procedimientos generales para la síntesis de isoquinolinas. Además, dichas isoquinolinas generadas por estos procedimientos pueden incorporarse fácilmente en los compuestos finales de Fórmula I usando los procedimientos descritos en este documento. En el siguiente esquema se muestra una metodología general para la síntesis de isoquinolinas, donde derivados de ácido cinnámico, mostrados en forma general como la estructura (2)



Referencia: N. Briet y col., Tetrahedron, 2002, 5761

se convierten en 1-cloroisoquinolinas en un procedimiento de cuatro etapas. Dichas cloroisoquinolinas pueden usarse posteriormente en reacciones de acoplamiento con derivados de C4-hidroxiprolina como se describe en este documento. La conversión de ácidos cinnámicos en cloroquinolinas comienza con el tratamiento de ácido cinnámico con un cloroformiato de alquilo en presencia de una base. Después, el anhídrido resultante se trata con azida sódica, lo que da como resultado la formación de una acilazida (3) como se muestra en el Esquema. Otros procedimientos alternativos están disponibles para la formación de acilazidas a partir de ácidos carboxílicos, por ejemplo, dicho ácido carboxílico puede tratarse con difenilfosforilazida (DPPA) en un disolvente aprótico tal como cloruro de metileno en presencia de una base. En la siguiente etapa de la secuencia de reacción, la acilazida (3) se convierte en la isoquinolona correspondiente (4) como se muestra en el Esquema. En ese caso, la acilazida se calienta a una temperatura de aproximadamente 190°C en un disolvente con alto punto de ebullición tal como el difenilmetano. Esta reacción es general y proporciona rendimientos de moderados a buenos de la isoquinolona sustituida a partir de los derivados de ácido cinnámico correspondientes. Debe apreciarse que dichos derivados de ácido cinnámico están disponibles en el mercado o pueden obtenerse a partir del derivado de benzaldehído correspondiente (1) por condensación directa con ácido malónico o derivados del mismo y también empleando una reacción de Wittig. El Las isoquinolonas intermedias (4) pueden convertirse en la 1-cloroisoquinolina correspondiente por tratamiento con oxiclورو de fósforo. Esta reacción es general y puede aplicarse a cualquiera de las isoquinolonas mostradas en este documento para convertir un sustituyente hidroxilo en el compuesto de cloro correspondiente.

Un procedimiento alternativo para la síntesis del sistema de anillos de isoquinolina es el procedimiento de Pomeranz-Fritsh. Este procedimiento general se resume a continuación. El procedimiento comienza con la conversión de un derivado de benzaldehído (1) en una imina funcionalizada (2). Después, dicha imina se convierte en el sistema de anillos de isoquinolina por tratamiento con ácido a temperatura elevada.

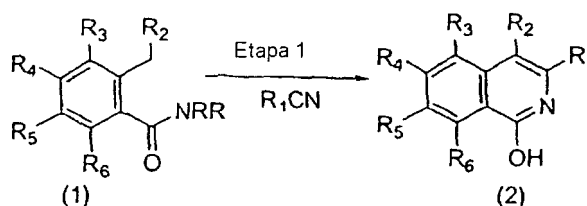


Síntesis de Pomeranz-Fritsch

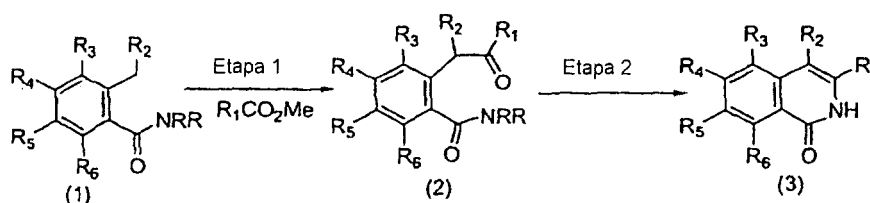
K. Hirao, R. Tsuchiya, Y. Yano, H. Tsue, Heterocycles 42(1) 1996, 415-422

Esta síntesis de isoquinolina que se ha indicado anteriormente es general, y debe apreciarse que este procedimiento es particularmente útil en la producción de intermedios de isoquinolina que están sustituidos en la posición C8 (nota: en el intermedio (3) del Esquema anterior, la posición C8 del anillo de isoquinolina está sustituida con el sustituyente R_6). Las isoquinolinas intermedias (3) pueden convertirse en las 1-cloroquinolinas correspondientes (5) en un procedimiento de dos etapas como el mostrado. La primera etapa en esta secuencia es la formación del N-óxido de isoquinolina (4) por tratamiento de la isoquinolina (3) con ácido meta-cloroperbenzoico en un disolvente aprótico tal como diclorometano. El intermedio (4) puede convertirse en la 1-cloroisoquinolina correspondiente por tratamiento con oxiclورو de fósforo en cloroformo a la temperatura de reflujo.

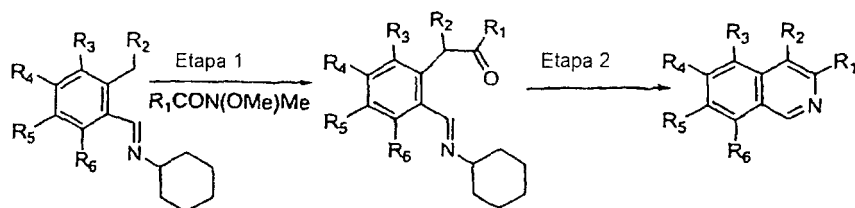
A continuación se muestra otro procedimiento para la síntesis del sistema de anillos de isoquinolina. En este procedimiento, un derivado de orto-alquilbenzamida (1) se trata con una base fuerte



tal como terc-butil litio en un disolvente tal como THF a baja temperatura. Después, a esta mezcla de reacción se le añade un derivado de nitrilo, que experimenta una reacción de adición con el anión obtenido a partir de la desprotonación de (1), dando como resultado la formación de (2). Esta reacción es general y puede usarse para la formación de isoquinolinas sustituidas. El intermedio (2) del esquema anterior puede convertirse en la 1-cloroisoquinolina correspondiente por los procedimientos descritos en este documento. A continuación se muestra un procedimiento adicional para la síntesis de isoquinolinas. La desprotonación del intermedio (1) usando terc-butil litio se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en presente procedimiento, dicho anión intermedio se purga con un éster, dando como resultado la formación del intermedio (2) como se muestra a continuación. En una reacción posterior, la cetona (2) se condensa con acetato de amonio a temperatura elevada, proporcionando la formación de la quinolona (3). Esta reacción es general y puede aplicarse para la construcción de isoquinolonas sustituidas que después se convierten en las 1-cloroisoquinolinas correspondientes como se describe en este documento.



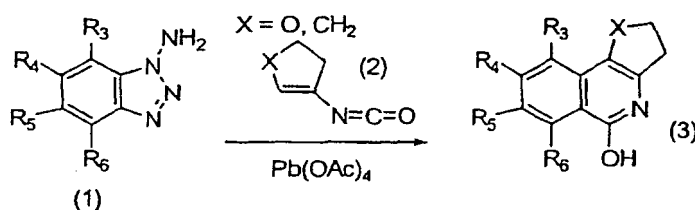
Otro método adicional para la construcción de isoquinolinas se encuentra en el siguiente esquema. En la primera etapa de este procedimiento, un derivado de orto-alquilarilimina tal como (1) se somete a condiciones de desprotonación (sec-butil litio, THF) y el anión resultante se inactiva



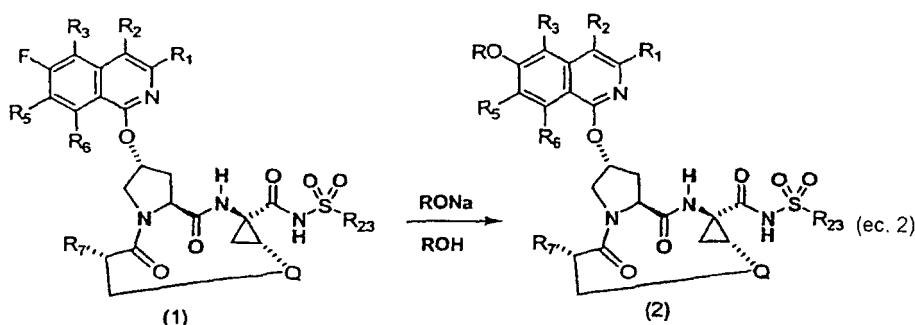
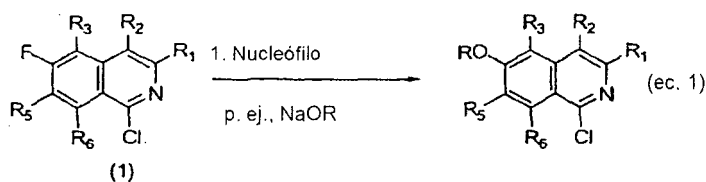
L. Flippin, J. Muchowski, JOC, 1993, 2631-2632

mediante la adición de un derivado de ácido carboxílico activado tal como una amida de Weinreb. La ceto imina resultante (2) puede convertirse en la isoquinolina correspondiente por condensación con acetato de amonio a temperaturas elevadas. Este procedimiento es general y puede usarse para la síntesis de isoquinolinas sustituidas. Dichas isoquinolinas pueden convertirse en la 1-cloroisoquinolina correspondiente por los procedimientos descritos en este documento.

La construcción de sistemas de anillos de isoquinolina funcionalizada también es posible empleando reacciones de cicloadición [4+2]. Por ejemplo, como se muestra a continuación, el uso de isocianatos de vinilo (1) en reacciones de cicloadición con precursores de bencino (2) proporciona isoquinolonas funcionalizadas (3). Dichas isoquinolonas pueden incorporarse en compuestos de Fórmula I usando los procedimientos descritos en este documento.

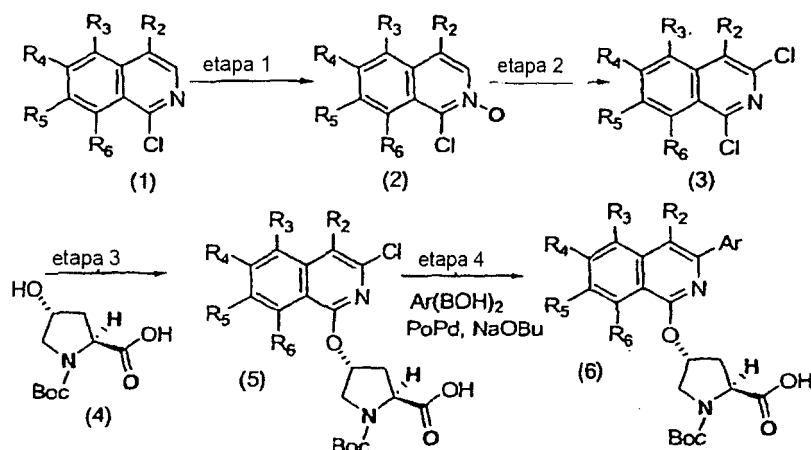


Las isoquinolinas descritas en este documento, y que se incorporan en los compuestos de Fórmula I, pueden funcionalizarse adicionalmente. Es evidente para un especialista en la técnica que la funcionalización adicional de dichos heterociclos puede realizarse antes o después de la incorporación de estas funcionalidades en compuestos de Fórmula I. Los siguientes esquemas ilustran este punto. Por ejemplo, el siguiente esquema muestra la conversión de una 1-cloro-6-fluoro-isoquinolina

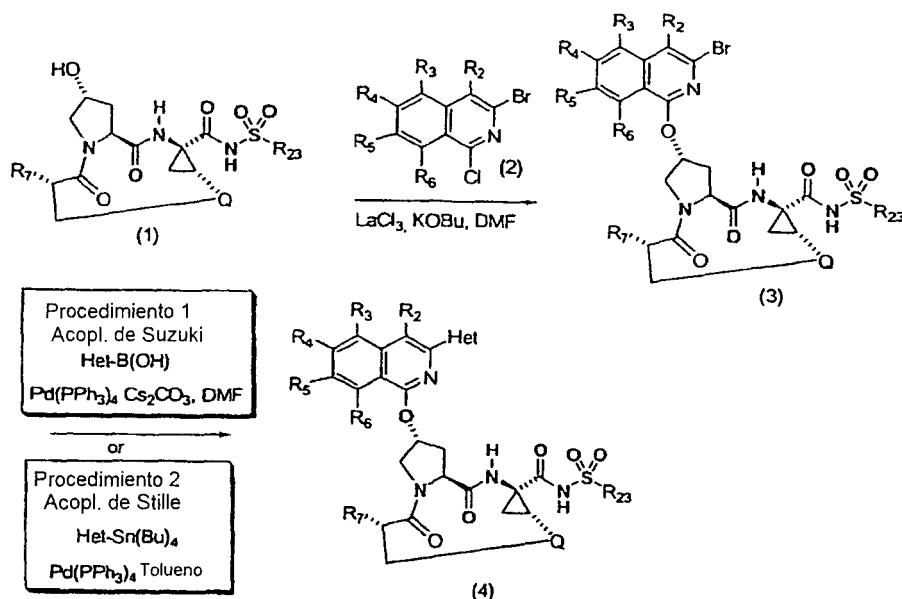


en la especie de 1-cloro-6-alcoxi-isoquinolina correspondiente, por tratamiento de (1) de (ec. 1) con una especie de alcóxido sódico o potásico en el disolvente alcohólico del que se obtiene el alcóxido a temperatura ambiente. En algunos casos, puede ser necesario calentar la reacción para completarla. El intermedio (2) de la ecuación 1 puede incorporarse en compuestos de Fórmula I por las enseñanzas de este documento. Como se muestra en la ecuación 2, la reacción análoga también puede realizarse sobre un sustrato en el que el elemento 6-fluoro-isoquinolina se ha incorporado en el macrociclo. Aquí, el tratamiento del intermedio 2 de la ecuación 2 con una especie de alcóxido sódico o potásico en el disolvente alcohólico a partir del cual se obtiene el alcóxido puede proporcionar compuestos de Fórmula I.

El esquema que se muestra a continuación proporciona un ejemplo general para la modificación de isoquinolinas que se han definido en este documento empleando reacciones de acoplamiento de paladio. Dichos acoplamientos pueden emplearse para funcionalizar una isoquinolina en cada posición del sistema de anillos, con la condición de que dicho anillo se active o funcionalice adecuadamente, como por ejemplo con un cloruro, como se muestra en el esquema. Esta secuencia comienza con la 1-cloroisoquinolina (1) que, después del tratamiento con ácido metacloropercbenzoico, puede convertirse en el N-óxido correspondiente (2). Dicho intermedio (2) puede convertirse en la 1,3-dicloroisoquinolina correspondiente (3) por tratamiento con oxiclورو de fósforo en cloroformo a la temperatura de reflujo. el intermedio (3) puede acoplarse con N-Boc-4-hidroxiprolina por los procedimientos descritos en este documento para proporcionar el intermedio (5) que se muestra en el Esquema. El intermedio (5) puede experimentar un acoplamiento de Suzuki con un ácido arilborónico, en presencia de un reactivo de paladio y una base, y en un disolvente tal como THF o tolueno o DMF para proporcionar el intermedio de C3-arilisoquinolina (6). Los ácidos heteroarilborónicos también pueden emplearse en este procedimiento de acoplamiento de Pd para proporcionar C3-heteroarilisoquinolinas. El intermedio (6) puede convertirse en los compuestos finales de Fórmula I por los procedimientos descritos en este documento.



Los acoplamientos mediados con paladio de sistemas de heteroarilo con elementos arilo o heteroarilo también pueden emplearse en una etapa sintética posterior en la construcción de compuestos de Fórmula I como se muestra a continuación. Aquí, el intermedio de acilsulfonamida de tripéptido de macrociclo (1) se acopla con una 1-cloro-3-bromoisoquinolina (2) usando el procedimiento descrito previamente de desplazamiento de alcóxido de un resto heteroarilhalo para proporcionar el intermedio (3). El acoplamiento de (1) y (2) puede excluirse en presencia de un catalizador tal como cloruro de lantano. El sistema de anillos de isoquinolina del intermedio (3) puede funcionalizarse adicionalmente empleando acoplamientos de Suzuki (Procedimiento 1: someter (3) a ácidos heteroaril o aril borónicos en presencia de un catalizador de paladio tal como tetraquis(trifenilfosfina)paladio y una base tal como carbonato de cesio en disolventes tales como DMF) o acoplamientos de Stille (Procedimiento 2: someter (3) a derivados de heteraril o aril estaño en presencia de catalizadores de paladio tales como tetraquis(trifenilfosfina) paladio en disolventes tales como tolueno).



La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención o un enantiómero farmacéuticamente aceptable, un diastereómero, sal, solvato o profármaco del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o un enantiómero farmacéuticamente aceptable, un diastereómero, sal o solvato del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, excipiente o diluyente vehículo.

El ingrediente activo, es decir, el compuesto, en tales composiciones típicamente comprende del 0,1 al 99,9 por ciento en peso de la composición y con frecuencia comprende de aproximadamente del 5 al 95 por ciento en peso.

Por tanto, en un aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende el compuesto de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición comprende además un compuesto que tiene actividad anti-VHC. Como se usa en este documento, la expresión "actividad anti-VHC" significa que el compuesto es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre el grupo constituido por metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada VHC, conjunto de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC, IMPDH y un análogo de nucleósido para el tratamiento de una infección de VHC. Frecuentemente, el otro compuesto que tiene actividad anti-VHC es eficaz para inhibir la función de diana en el ciclo de vida de VHC diferente a la proteína proteasa NS3 de VHC.

En un aspecto preferido, el compuesto que tiene actividad anti-VHC es un interferón. Preferiblemente, el interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón linfoblastoide tau.

En otro aspecto de la invención, el compuesto que tiene actividad anti-VHC se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que mejora el desarrollo de una respuesta de células T ayudantes de tipo 1, ARN interferente, ARN anti-sentido, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5' monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

En un aspecto preferido de la invención, la composición comprende un compuesto de la invención, un interferón y ribavirina.

En otro aspecto preferido de la invención, el compuesto que tiene actividad anti-VHC es un compuesto de molécula pequeña. Como se usa en este documento, la expresión "compuesto de molécula pequeña" significa un compuesto que tiene un peso molecular de menos de 1500 daltons, preferiblemente menos de 1000 daltons. Preferiblemente, el compuesto de molécula pequeña es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre el grupo constituido por metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, conjunto de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC, inosina monofosfato deshidrogenasa ("IMPDH") y un análogo de nucleósido para el tratamiento de una infección de VHC.

Ciertos compuestos inhibidores de VHC ilustrativos que se pueden administrar con los compuestos de la presente invención incluyen los descritos en las publicaciones siguientes: el documento WO 02/04425 A2 publicado el 17 de enero de 2002, el documento WO 03/007945 A1 publicado el 30 de enero de 2003, el documento WO 03/010141 A2

ES 2 320 771 T3

publicado e 6 de febrero de 2003, el documento WO 03/010142 A2 publicado el 6 de febrero de 2003, el documento WO 03/010143 A1 publicado el 6 de febrero de 2003, el documento WO 03/000254 A1 publicado el 3 de enero de 2003, el documento WO 01/32153 A2 publicado el 10 de mayo de 2001, el documento WO 00/06529 publicado el 10 de febrero de 2000, el documento WO 00/18231 publicado el 6 de abril de 2000, el documento WO 00/10573
5 publicado el 2 de marzo de 2000, el documento WO 00/13708 publicado el 16 de marzo de 2000, el documento WO 01/85172 A1 publicado el 15 noviembre de 2001, el documento WO 03/037893 A1 publicado el 8 de mayo de 2003, documento WO 03/037894 A1 publicado el 8 de mayor de 2003, el documento WO 03/037895 A1 publicado el 8 de mayo de 2003, el documento WO 02/100851 A2 publicado el 19 de diciembre de 2002, el documento WO 02/100846 A1 publicado el 19 de diciembre de 2002, el documento EP 1256628 A2 publicado el 13 de noviembre de 2002, el
10 documento WO 99/01582 publicado el 14 de enero de 1999, el documento WO 00/09543 publicado el 24 de febrero de 2000.

La Tabla 1 más adelante enumera algunos ejemplos ilustrativos de compuestos que se pueden administrar con los compuestos de esta invención. Los compuestos de la invención se pueden administrar con otros compuestos de activi-
15 dad anti-VHC en terapia de combinación tanto conjuntamente como separadamente o combinando los compuestos en una composición.

TABLA 1

Nombre Comercial	Tipo de Inhibidor o Diana	Compañía Proveedora
Omega IFN	INF- ω	Biomedicinas Inc., Emeryville CA
BILN-2061	inhibidor de serina proteasa	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Alemania
Summetrel	antiviral	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
Roferon A	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
Pegasys	IFN- α 2a PEGilado	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
Pepasys y Ribavirina	IFN- α 2a PEGilado /ribavirina	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
CellCept	inmunosupresor IgG de	F. Hoffmann-La Roche

ES 2 320 771 T3

	VHC	LTD, Basel, Suiza
Wellferon	IFN linfoblastoide- α 1	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, RU
Albuferon- α	albúmina IFN- α 2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Levovirina	ribavirina	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
IDN-6556	inhibidor de caspasa	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
IP-501	antifibrótico	Indevus Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
Actimmune	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
Infergen A	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
ISIS 14803	antisentido	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., Nueva York, NY
JTK-003	inhbitor de RdRp	Japan Tobacco Inc., Tokio, Japón
Pegasys y Ceplene	IFN- α 2a PEGilado / modulador immune	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Ceplene	modulador inmune	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Civacir	Inmunosupresor IgG de VHC	Nabi Biopharmaceuticals Inc., Boca Raton, FL
Intrón A y Zadaxin	IFN- α 2b/ α 1-timosina	RegeneRx Biopharmaceuticals Inc., Bethesda MD/SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA
Levovirina	inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa,

		CA
Viramidina	inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	ribozima	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
Intrón A	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intrón	IFN- α 2b PEGilado	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Rebetron	IFN- α 2b/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Ribavirina	ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intrón/Ribavirina	INF- α 2b PEGilado/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Zadazim	modulador inmune	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Matero, CA
Rebif	IFN- β 1a	Serono, Geneva, Suiza
IFN- β y EMZ701	IFN- β y EMZ701	Transition Therapeutics Inc" Ontario, Canadá
T67	inhibidor de β -tubulina	Tularik Inc" South San Francisco, CA
VX-497	inhibidor de IMPDH	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
VX-950/LY-570310	inhibidor de serina proteasa	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA Eli Lilly and Co. Inc. Indianápolis, IN
Omniferon	IFN- α natural	Viragen Inc., Plantation, FL
XTL-002	anticuerpo monoclonal	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Isreal

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral, parenteral o por un depósito implantado. Se prefieren la administración oral o la administración mediante inyección. En algunos casos, se puede ajustar el pH de la formulación con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de administración. El término parenteral como se usa en este documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutáneas, intracutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intrasinoiales, intraesternales, intratecales e intralesionales.

Cuando se administran por vía oral, las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen

lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran oralmente suspensiones acuosas, el ingrediente activo se combina con agentes emulsificantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o saporíferos y/o colorantes. Otros vehículos adecuados para las composiciones mencionadas anteriormente se pueden observar en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 19ª ed. Marck Publishing Company, Easton, Penn., 1995.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos usando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles. Las composiciones de esta invención se pueden formular para proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica. En la preparación de las composiciones de la presente invención, el ingrediente activo habitualmente se mezclará con un vehículo o se diluirá con un vehículo o se incluirá dentro de un vehículo que puede estar en forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como un diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como un vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, perlas microencapsuladas, grageas, bolsitas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), cápsulas de gelatina suave y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles y similares. Los especialistas en la técnica conocen los detalles adicionales que conciernen al diseño y preparación de formas de administración adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la invención.

Los niveles de dosis de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1000 miligramos por kilogramo ("mg/kg") de peso corporal por día, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos de la invención son típicos en una monoterapia para la prevención y el tratamiento de enfermedad mediada por VHC. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Tal administración se puede usar como una terapia crónica o aguda. La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del huésped tratado y de la vía de administración particular.

Como lo apreciarán los especialistas en la técnica, se pueden requerir dosis mayores o menores que las enumeradas anteriormente. Los regímenes de dosificación y tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerán de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y ciclo de la infección, la predisposición del paciente a la infección y el criterio del médico tratante. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas sustancialmente menores que la dosis óptima del péptido. A partir de entonces, la dosis se aumenta mediante incrementos pequeños hasta que se consigue el efecto óptimo en las circunstancias. En general, el compuesto se administra más deseablemente a un nivel de concentración que generalmente proporcionará resultados anti-viralmente eficaces sin causar ningún efecto secundario dañino o nocivo.

Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional habitualmente están presentes en niveles de dosis de entre aproximadamente el 10 y el 100% y más preferiblemente entre aproximadamente el 10 y el 80% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia.

Cuando estos compuestos o sus enantiómeros farmacéuticamente aceptables, diastereómeros, sales, solvatos o profármacos se formulan en conjunto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, la composición resultante se puede administrar *in vivo* a mamíferos, tales como el ser humano, para inhibir la proteasa NS3 de VHC o para tratar o prevenir la infección por virus de VHC.

Por consiguiente, otro aspecto de esta invención proporciona el uso, para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad proteasa NS3 de VHC en pacientes, de un compuesto de la presente invención o un enantiómero farmacéuticamente aceptable, diastereómero, sal o solvato del mismo.

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso, para la preparación de un medicamento para tratar una infección de VHC en un paciente, del compuesto de la invención o un enantiómero farmacéuticamente aceptable, diastereómero, solvato o sal del mismo.

Preferiblemente, el uso es eficaz para inhibir la función de la proteína proteasa NS3 de VHC. En un aspecto preferido, el uso comprende además administrar otro compuesto que tiene actividad anti-VHC (como se ha descrito anteriormente) antes de, después o simultáneamente con un compuesto de la invención.

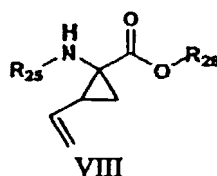
Los compuestos de la invención también se pueden usar como compuestos reactivos de laboratorio y pueden contribuir decisivamente para proporcionar herramientas de investigación para el diseño de ensayos de replicación viral, la validación de sistema de ensayo animal y estudios de biología estructural para mejorar adicionalmente el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad de VHC. Además, los compuestos de la presente invención son útiles para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos anti-virales, por ejemplo, mediante inhibición competitiva.

Los compuestos de esta invención también se pueden usar para tratar o evitar la contaminación viral de materiales y por lo tanto reducir el riesgo de infección viral de personal de laboratorio o médico o pacientes que se ponen en contacto con tales materiales, por ejemplo, sangre, tejido, instrumentos e indumentaria quirúrgica, instrumentos e indumentaria de laboratorio y aparatos y materiales de recolección o transfusión de sangre.

Además, las composiciones de la invención se pueden usar para la preparación de un medicamento para tratar la infección de VHC en un paciente.

También se describen los procedimientos para resolver una mezcla de enantiómeros de alquil éster que comprende poner en contacto la mezcla con una enzima eficaz para estimular preferiblemente la hidrólisis de uno de los enantiómeros; caracterizado por que el contacto se conduce en presencia de un tampón. Una mezcla de este tipo de enantiómeros de éster de alquilo se puede producir como resultado de la preparación del precursor químico B, descrito anteriormente.

Típicamente el éster de alquilo tiene la siguiente Fórmula:



donde:

R25 es un grupo protector amino, tal como, por ejemplo carbamatos, por ejemplo iminas BOC o amidas; y

R26 se selecciona entre el grupo constituido por alquilo C₁₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, alquilarilo C₇₋₁₆, cicloalquilo C₃₋₇ o cicloalquil alquilo C₃₋₁₀.

El tampón particular usado en este procedimiento no es crítico. Típicamente, el tampón tendrá un pKa de ± 1 del pH al que se conduce la hidrólisis, por ejemplo, pH de aproximadamente 7,0 a 11. Por tanto, si la hidrólisis se conduce, por ejemplo, a un pH de 8,0, se puede usar un tampón con un pKa de aproximadamente 7,0 a 9,0. Los tampones típicos son fosfatos, boratos y carbonatos. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen: ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanosulfónico, ácido N-(2-acetamido)-2-imino-diacético, n,n-bis(2-hidroxi-etil)glicina, 1,3-bis[tris(hidroxi-metil)metilamino]propano, ácido o-Bórico, ácido carbónico, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido dietilmalónico, Glicilglicina, ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES), ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-3-propano-sulfónico, imidazol, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, ácido o-fosfórico, piperazina-N-N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico), ácido 3-[tris(hidroxi-metil)metil]amino propanosulfónico, ácido 2-[tris(hidroxi-metil)metil]amino etanosulfónico, N-[tris(hidroxi-metil)metil]glicina y tris(hidroxi-metil)aminometano.

Se puede usar cualquier enzima eficaz para hidrolizar preferiblemente el enantiómero del éster de alquilo deseado. Con frecuencia se usan proteasas, lipasas y esterases para la hidrólisis de uniones de éster carboxílicos. Las enzimas adecuadas para el uso, independientemente de su origen o pureza, se pueden emplear en estado libre, formas tanto líquidas como secas, o inmovilizadas sobre un soporte tal como, por ejemplo, mediante adsorción física o inmovilización. Los ejemplos de lipasas incluyen lipasas de *Candida rugosa*, Germen de Trigo, Páncreas Porcino, *Rhizopus arrhizus*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, especies de *Pseudomonas*, *Candida lipolytica*, *Humicola langinosa* y *Mucor javanicus*. Los ejemplos de esterases incluyen esterasa de hígado de cerdo (PLE), esterasa de hígado de caballo (HLE), acetilcolina esterasa (ACE), colesterol esterasa y esterasa del *Bacillus subtilis* (carboxil esterasa NP). Las proteasas generalmente se definen como hidrolasas que actúan sobre uniones peptídicas como sus sustratos naturales, pero que tienen la capacidad de escindir una unión de éster carboxílico ya que una unión de éster es mucho más débil que una unión peptídica (amida). Los ejemplos de proteasas incluyen α -quimotripsina, termolisina, papaína, proteasas de *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Streptomyces griseus*.

En el éster de la Fórmula VIII, el centro quiral en el resto ácido está completamente sustituido. Esto representa una diana difícil para las enzimas hidrolíticas ya que sus sustratos naturales (tales como aminoácidos naturales) habitualmente contienen al menos un α -hidrógeno. Con gran sorpresa, se ha observado que ciertas proteasas fueron altamente eficaces para la hidrólisis enantioselectiva del éster VIII. Las proteasas típicas incluyen proteasas de cepas seleccionadas entre el grupo constituido por *Bacillus globigii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus clausii* y *Aspergillus oryzae*. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen las seleccionadas entre el grupo constituido por Alcalase® (subtilisina, proteasa alcalina, Novozymes North America Inc., Franklinton, NC), Savinase® (subtilisina, proteasa alcalina, Novozymes), ChiroCLEC™-BL (subtilisina, proteasa alcalina, Altus Biologics, Inc.), Proteasa N (subtilisina, proteasa alcalina, Amano) y Flavourzyme™ (proteasa fúngica/peptidasa, Novozymes). En la técnica se conocen los detalles adicionales de tales enzimas. Tales enzimas están disponibles en el mercado. Estas enzimas se pueden emplear solas o usar como mezclas de las mismas.

La hidrólisis del éster conduce a la liberación de un alcohol y un ácido carboxílico, que puede disminuir significativamente el pH si no hay tampón presente. Se ha observado que incluir tampón en la mezcla de reacción puede estabilizar el pH en el ciclo de hidrólisis, contribuyendo de ese modo a una mayor actividad y estabilidad enzimática.

- Además, es posible conducir la hidrólisis a temperaturas elevadas, preferiblemente, aproximadamente de 30 a 60°C y durante periodos de tiempo cortos, preferiblemente menos de aproximadamente siete días, más preferiblemente de aproximadamente dos horas a tres días.

Ejemplos

Los ejemplos específicos que se muestran a continuación ilustran la síntesis de los compuestos de la presente invención. Los procedimientos pueden adaptarse a variaciones con el fin de producir compuestos incluidos por esta invención pero no descritos de forma específica. Además, las variaciones de los procedimientos para producir los mismos compuestos algo diferentes también serán evidentes para un especialista en la técnica.

Las abreviaturas químicas usadas habitualmente para identificar compuestos químicos descritos en este documento incluyen Bn: bencilo; Boc: terc-butiloxycarbonilo {Me₃COC(O)}; BSA: albúmina de suero bovino; CDI: carbonildiiimidazol; DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno; CH₂Cl₂=DCM: cloruro de metileno; TBME: terc-butil metil éter; DEAD: azodicarboxilato de dietilo; DIAD: azodicarboxilato de diisopropilo; DIEA: diisopropiletilamina; DIPEA: diisopropiletilamina; 4-DMAP: 4-dimetil-aminopiridina; DCC: 1,3-diciclohexilcarbodiimida; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; DPPA: difenilfosforil azida; Et: etilo; EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Catalizador de Grubb: dicloruro de bis(triciclohexilfosfina)bencilideno rutenio (IV); Catalizador de Grubb de 2ª Generación: dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno][bencilideno] rutenio (IV); HATU: hexafluorofosfato de [O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio]; HBTU: hexafluorofosfato de [O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio]; HOBt, 1-hidroxibenzotriazol; HOAT, 1-hidroxibenzotriazol; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; EM: espectrometría de masas; Me: metilo; MeOH: metanol; NMM: N-metilmorfolina; NMP: N-metilpirrolidina; Pr: propilo; PPA: ácido polifosfórico; TBAF: fluoruro de tetra-n-butilamonio; 1,2-DCE o DCE: 1,2-dicloroetano; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano.

Los porcentajes en solución expresan una relación de peso a volumen, y las proporciones de solución expresan una relación de volumen a volumen, a menos que se indique lo contrario. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker de 300, 400 ó 500 megahertzios (MHz); los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón. La cromatografía ultrarrápida se realizó sobre gel de sílice (SiO₂) evidente para un especialista en la técnica. Todos los datos de Cromatografía Líquida (CL) se registraron en un cromatógrafo de líquidos Shimadzu LC-10AS usando un detector SPD-IOAV UV-Vis y los datos de Espectrometría de Masas (EM) se determinaron con una Plataforma Micromass para CL en modo de electronebulización (ES+).

A menos que se indique otra cosa, cada compuesto se analizó por CL/EM, usando una de tres metodologías, que tienen las siguientes condiciones.

Columnas:	Procedimiento A) - YMC Xterra ODS S7 micrómetros ("μm") 3,0 x 50 milímetros ("mm") es decir, 3,0 mm de diámetro por 50 mm de longitud.
Gradiente:	100% de Disolvente A/0% de Disolvente B a 0% de Disolvente A/100% de Disolvente B
Tiempo de gradiente:	4 min (A)
Tiempo de mantenimiento:	1 min (A); 2 min
Caudal:	4 ml/min
Longitud de Onda del Detector:	220 nanómetros ("nm")
Disolvente A:	MeOH al 10%/H ₂ O al 90%/TFA al 0,1%
Disolvente B:	H ₂ O al 10%/MeOH al 90%/TFA al 0,1%.
Columnas:	Procedimiento B) - YMC Xterra ODS S7 3,0 x 50 mm
Gradiente:	100% de Disolvente A/0% de Disolvente B a 0% de Disolvente A/100% de Disolvente B
Tiempo de gradiente:	2 min
Tiempo de mantenimiento:	1 min

ES 2 320 771 T3

Caudal: 5 ml/min

Longitud de Onda del Detector: 220 nm

5 Disolvente A: MeOH al 10%/H₂O al 90%/TFA al 0,1%

Disolvente B: H₂O al 10%/MeOH al 90%/TFA al 0,1%.

10 Columnas: Procedimiento D) - YMC Xterra C18 5 mM 3,0 x 50 mm

Gradiente: 100% de Disolvente A/0% de Disolvente B a 0% de Disolvente A/100% de Disolvente B

15 Tiempo de gradiente: 3 min

Tiempo de mantenimiento: 1 min

Caudal: 5 ml/min

20 Longitud de Onda del Detector: 220 nm

Disolvente A: MeOH al 10%/H₂O al 90%/TFA al 0,1%

25 Disolvente B: H₂O al 10%/MeOH al 90%/TFA al 0,1%.

A menos que se indique otra cosa, la HPLC preparativa se realizó en las siguientes condiciones.

30 Tiempo de gradiente: 10 min

Tiempo de mantenimiento: 2 min

Caudal: 25 ml/min

35 Longitud de Onda del Detector: 220 nM

Disolvente A: MeOH al 10%/H₂O al 90%/TFA al 0,1%

40 Disolvente B: H₂O al 10%/MeOH al 90%/TFA al 0,1%

45 Las fracciones puras se combinaron y se usó NaOH 0,1 N para llevar el pH a 7. La solución se concentró al vacío y después el pH se redujo cuidadosamente a pH 3-4 usando HCl 0,1 N. La mezcla se extrajo rápidamente con acetato de etilo (3 x). Los extractos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar los productos purificados.

Los compuestos e intermedios químicos de la presente invención, descritos en los siguientes ejemplos, se prepararon de acuerdo con los siguientes procedimientos.

50 Ejemplo 1

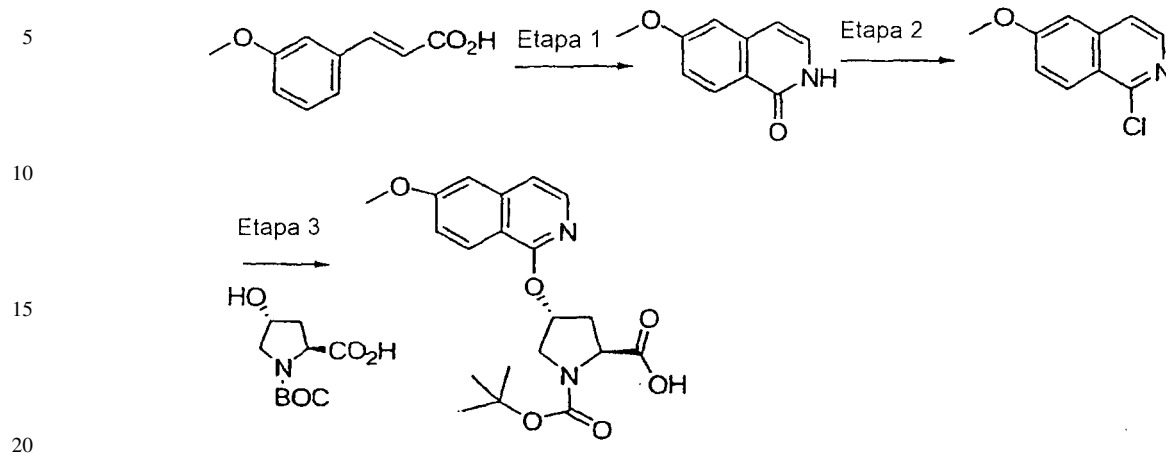
Preparación de Intermedios Representativos

55 Preparación de intermedios de isoquinolina P2 para la incorporación en compuestos de Fórmula 1.

60

65

Procedimiento A



Etapa 1

25 A una solución de ácido 3-metoxicinnámico (11,04 g, 62 mmol) y trietilamina (12,52 g, 124 mmol) en acetona (80 ml) se le añadió gota a gota cloroformiato de etilo (aproximadamente 1,5 equivalentes) a 0°C. Después de agitar a esta temperatura durante 1 h, se añadió gota a gota NaN₃ acuoso (6,40 g, 100 mmol en 35 ml de H₂O; deben tomarse las precauciones apropiadas cuando se usa azida sódica) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 h a la temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (100 ml) y el volátil se retiró al vacío. La suspensión resultante se extrajo con tolueno (3 x 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄. Esta solución seca se añadió gota a gota a una solución caliente de difenilmetano (50 ml) y tributilamina (30 ml) a 190°C. El tolueno se retiró por destilación según se añadía. Después de que se completara la adición, la temperatura de reacción se aumentó hasta 210°C durante 2 h. Después de un periodo de refrigeración, el producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con hexano (2 x 50 ml) y se secó para producir el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (5,53 g, 51%) (Nicolas Briet y col., Tetrahedron, 2002, 5761-5766). CL-EM (tiempo de retención: 0,82 min, procedimiento B), EM *m/z* 176 (M⁺+H).

30

35

Un procedimiento alternativo al anterior emplea difenilfosforil azida para la conversión del ácido carboxílico en la acilazida correspondiente. Después, en un procedimiento de una sola etapa, el ácido se convierte en la quinolona correspondiente. Este procedimiento se describe a continuación para la preparación de 4-metil-2*H*-isoquinolin-1-ona a partir de ácido 3-fenil-but-2-enoico:

40

Una solución de ácido 3-fenil-but-2-enoico (16,2 g), difenilfosforil azida (27,5 g) y trietilamina (10,1 g) en benceno (100 ml) se agitó durante 1 h. Después de la filtración a través de un lecho de gel de sílice lavando con benceno y de la concentración, el residuo se disolvió en difenilmetano (80 ml) y se calentó a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a ta, los sólidos se recogieron a través de un lecho lavando con benceno y se secaron para dar 10 g (63%) de la 4-metil-2*H*-isoquinolin-1-ona deseada en forma de un sólido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 2,30 (s, 3 H), 7,00 (s, 1 H), 7,54 (m, 1 H), 7,77 (m, 2 H), 8,33 (d, *J* = 7,34 Hz, 1 H).

45

Etapa 2

Se calentó 6-metoxi-2*H*-isoquinolin-1-ona (5,0 g, 28,4 mmol) en POCl₃ (10 ml) a suave reflujo durante 3 h y se evaporó al vacío (Nicolas Briet y col., Tetrahedron, 2002, 5761-5766). El residuo se vertió en agua enfriada con hielo (20 ml) y se neutralizó a pH 10 con NaOH 10 M. Se extrajo con CHCl₃. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (1:1 de hexano-EtOAc) para producir 4,41 g (80%) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (CD₃OD) δ 3,98 (s, 3H), 7,34-7,38 (m, 2H), 7,69 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,23 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,42 min, procedimiento B), EM *m/z* 194 (M⁺+H).

50

55

Etapa 3

A una solución de N-BOC-3-(R)-hidroxi-L-prolina (892 mg, 3,89 mmol) en DMSO (40 ml) a la temperatura ambiente se le añadió en una porción terc-butoxido potásico (1,34 g, 12,0 mmol). La suspensión formada se agitó a esta temperatura durante 30 min antes de enfriarse a 10°C. Se añadió en una porción 1-cloro-6-metoxi-isoquinolina (ejemplo 11, Etapa 2) (785 mg, 4,05 mmol) en forma de un sólido y la mezcla final se agitó a la temperatura ambiente durante 12 h. Se inactivó ácido cítrico al 5% enfriado con hielo (ac.) y se extrajo con EtOAc (100 ml). La fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con ácido cítrico al 5% (ac.) y salmuera

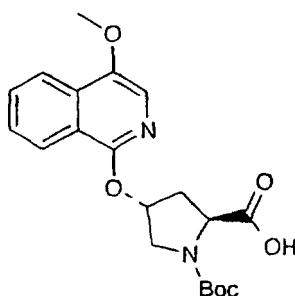
60

65

ES 2 320 771 T3

respectivamente, se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. El filtrado se evaporó al vacío a sequedad para producir 1,49 g (99%) del producto deseado en forma de una espuma de color blanquecino. Este material se usó en bruto en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. ^1H RMN (CD_3OD) δ 1,42, 1,44 (rotámeros, 9H), 2,38-2,43 (m, 1H), 2,66-2,72 (m, 1H), 3,80-3,87 (m, 2H), 3,92 (s, 3H), 4,44-4,52 (m, 1H), 5,73 (a, 1H), 7,16-7,18 (m, 2H), 7,24-7,25 (m, 1H), 7,87-7,88 (m, 1H), 8,07 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,62 min, procedimiento B), EM m/z 389 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

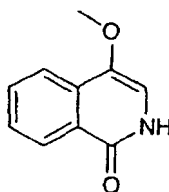
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapas 1

Modificación: se usaron 15 g de ácido 3-metoxi-3-fenil-acrílico, se obtuvieron 250 mg de producto (2% de rendimiento).

Producto:

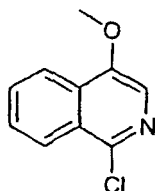


^1H RMN (400 MHz, CD_3COCD_3) δ ppm 3,85 (s, 3 H), 6,96 (s, 1 H), 7,54 (m, 1 H), 7,71 (m, 1 H), 7,86 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H), 8,31 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H).

Etapas 2

Modificaciones: Se usaron 200 mg 4-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 150 mg de producto (68% de rendimiento).

Producto:



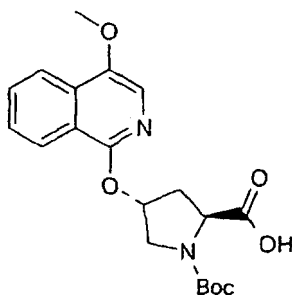
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4,05 (s, 2 H), 7,71 (m, 1 H), 7,72 (m, 2 H), 7,80 (s, 1 H), 8,23 (dd, $J = 18,71, 7,70$ Hz, 2 H).

Etapas 3

Modificaciones: se usaron 122 mg de 1-cloro-4-metoxi-isoquinolina, se obtuvieron 218 mg de producto (89% de rendimiento).

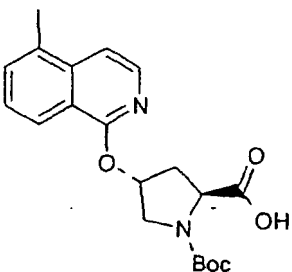
ES 2 320 771 T3

Producto:



EM: (M+Na)⁺ 411.

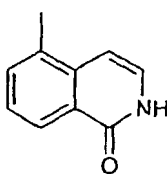
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapla 1

Modificaciones: se usaron 20 g de ácido 2-metilcinnámico, se obtuvieron 14,3 g del producto (72% de rendimiento).

Producto:

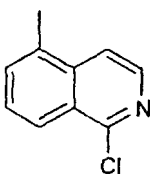


Datos: ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 2,54 (s, 1 H), 6,69 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,23 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,39 (t, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,50 (d, *J* = 7,1 Hz, 1 H), 8,30 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 11,62 (s, 1 H); EM: (M+H)⁺ 160.

Etapla 2

Modificaciones: se usaron 14,4 g de 5-metil-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 10,6 g del producto (66% de rendimiento).

Producto:



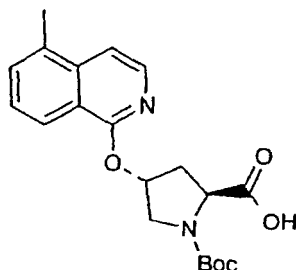
Datos: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,67 (s, 3 H), 7,55 (m, 2 H), 7,70 (dd, *J* = 5,9, 1,0 Hz, 1 H), 8,19 (m, 1 H), 8,28 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H); EM: (M+H)⁺ 178.

ES 2 320 771 T3

Etapa 3

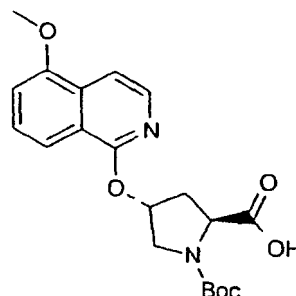
Modificaciones: se usaron 533 mg de 1-cloro-5-metil-isoquinolina, se obtuvieron 1116 mg del producto (100% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: (M+H)⁺ 373.

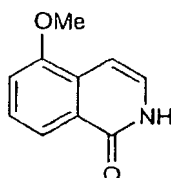
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapa 1

Modificaciones: se usaron 10 g de ácido 2-metoxicinnámico, se obtuvieron 5,3 g del producto (53% de rendimiento).

Producto:



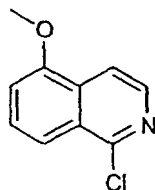
Datos: ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 3,95 (s, 3 H), 6,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,08 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,14 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,43 (t, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,99 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 10,92 (s, 1 H); EM: (M+H)⁺ 176.

Etapa 2

Modificaciones: se usaron 5,3 g de 5-metoxi-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 5,38 g del producto (92% de rendimiento).

ES 2 320 771 T3

Producto:

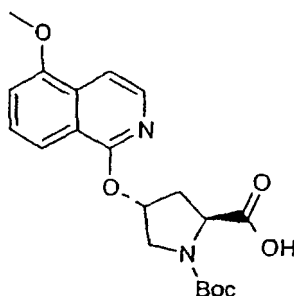


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4,01 (s, 3 H), 7,04 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H), 7,57 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H), 7,88 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 7,97 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H), 8,25 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 194.

Etapas 3

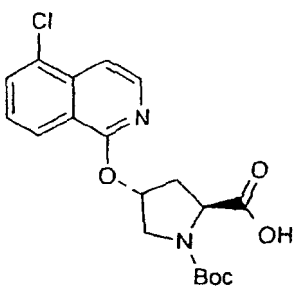
Modificaciones: se usaron 581 mg de 1-cloro-5-metoxi-isoquinolina, se obtuvieron 1163 mg del producto (100% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 389.

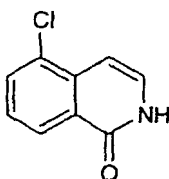
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapas 1

Modificaciones: se usaron 25 g de ácido 2-clorocinnámico, se obtuvieron 14,6 g del producto (59% de rendimiento).

Producto:



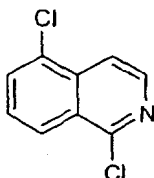
ES 2 320 771 T3

Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,22 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,42 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H), 7,73 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H), 8,34 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H), 10,61 (s, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 180.

Etapa 2

Modificaciones: se usaron 14,2 g de 5-cloro-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 8,28 g del producto (53% de rendimiento).

Producto:

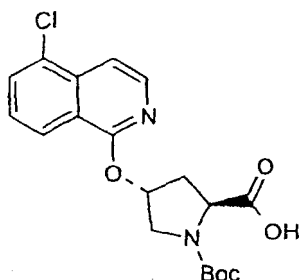


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,60 (dd, $J = 8, 6, 7,6$ Hz, 1 H), 7,83 (m, 1 H), 8,00 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H), 8,29 (dt, $J = 8,9, 1,0$ Hz, 1 H), 8,38 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 198.

Etapa 3

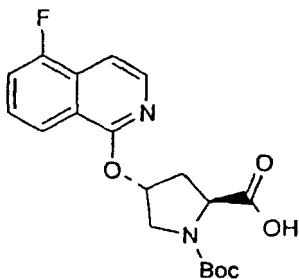
Modificaciones: se usaron 594 mg de 1,5-dicloro-isoquinolina, se obtuvieron 1174 mg del producto (100% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 393.

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

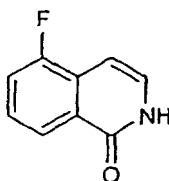


Etapa 1

Modificaciones: se usaron 16,6 g de ácido 2-fluorocinnámico, se obtuvieron 8,55 g del producto (51% de rendimiento).

ES 2 320 771 T3

Producto:

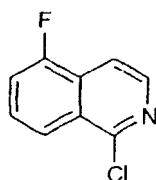


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3COCD_3) δ ppm 6,62 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,32 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,47 (m, 2 H), 8,09 (m, 1 H).

Etapas 2

Modificaciones: se usaron 8,4 g de 5-fluoro-2H-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 7,5 g del producto (80% de rendimiento).

Producto:

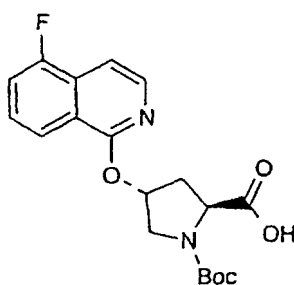


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,43 (ddd, $J = 9,7, 7,8, 0,9$ Hz, 1 H), 7,62 (td, $J = 8,2, 5,4$ Hz, 1 H), 7,84 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H), 8,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 8,33 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 182.

Etapas 3

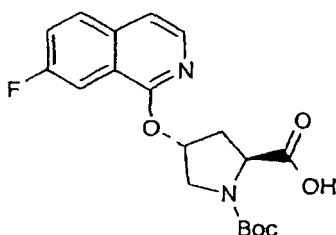
Modificaciones: se usaron 203 mg de 1-cloro-5-fluoro-isoquinolina, se obtuvieron 384 mg de producto (90% de rendimiento).

Producto:



Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3SOCD_3) δ ppm 1,34, 1,36 (2s, 9 H, rotámeros), 2,35 (m, 1 H), 2,61 (m, 1 H), 3,65 (d, $J = 12,23$ Hz, 1 H), 3,80 (m, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 5,70 (s, 1 H), 7,48 (d, $J = 6,11$ Hz, 1 H), 7,63 (m, 2 H), 7,99 (m, 1 H), 8,10 (d, $J = 5,87$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{Na})^+$ 399.

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

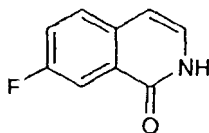


ES 2 320 771 T3

Etapla 1

Modificaciones: se usaron 16,6 g de ácido 4-fluorocinnámico, se obtuvieron 8,2 g del producto (49% de rendimiento).

Producto:

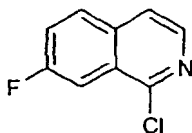


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3COCD_3) δ ppm 6,57 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 7,21 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 7,50 (m, 1 H), 7,72 (dd, $J = 8,68, 5,26$ Hz, 1 H), 7,90 (dd, $J = 9,54, 2,93$ Hz, 1 H).

Etapla 2

Modificaciones: Se usaron 8,15 g de 7-fluoro-2H-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 7,6 g del producto (84% de rendimiento).

Producto:

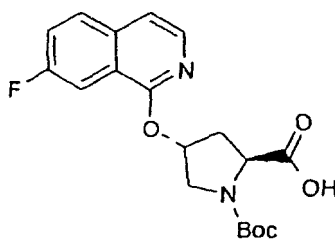


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,52 (td, $J = 8,6, 2,6$ Hz, 1 H), 7,59 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H), 7,86 (dd, $J = 9,1, 5,4$ Hz, 1 H), 7,95 (dd, $J = 9,5, 2,5$ Hz, 1 H), 8,26 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 182.

Etapla 3

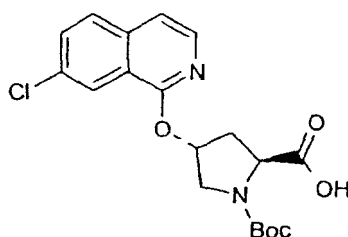
Modificaciones: se usaron 191 mg de 1-cloro-7-fluoro-isoquinolina, se obtuvieron 350 mg de producto (93% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: $(\text{M}+\text{Na})^+$ 399.

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

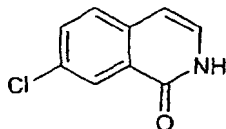


ES 2 320 771 T3

Etapla 1

Modificaciones: se usaron 9,13 g de ácido 4-clorocinnámico, se obtuvieron 4 g del producto (44% de rendimiento).

Producto:

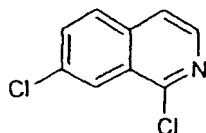


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3SOCD_3) δ ppm 6,58 (d, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 7,20 (dd, $J = 7,1, 5,9$ Hz, 1 H), 7,72 (m, 2 H), 8,10 (m, 1 H).

Etapla 2

Modificaciones: se usaron 3,5 g de 7-cloro-2H-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 2,8 g del producto (72% de rendimiento).

Producto:

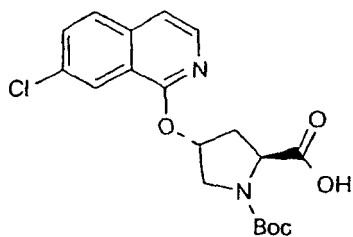


Datos: ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,59 (d, $J = 5,5$ Hz, 1 H), 7,69 (dd, $J = 8,9, 2,1$ Hz, 1 H), 7,80 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 8,29 (d, $J = 5,5$ Hz, 1 H), 8,34 (s, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 198.

Etapla 3

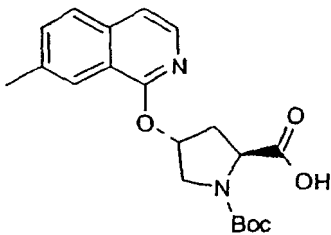
Modificaciones: se usaron 208 mg de 1,7-dicloro-isoquinolina, se obtuvieron 350 mg de producto (89% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: $(\text{M}+\text{Na})^+$ 415.

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

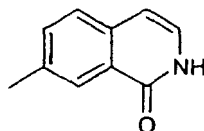


ES 2 320 771 T3

Etapla 1

Modificaciones: se usaron 25 g de ácido 4-metilcinnámico, se obtuvieron 15,3 g del producto (62% de rendimiento).

Producto:

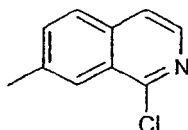


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 2,50 (s, 3 H), 6,54 (d, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 7,13 (d, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 7,49 (m, 2 H), 8,22 (s, 1 H), 11,49 (s, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 160.

Etapla 2

Modificaciones: se usaron 15,3 g de 7-metil-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 5,15 g del producto (30% de rendimiento).

Producto:

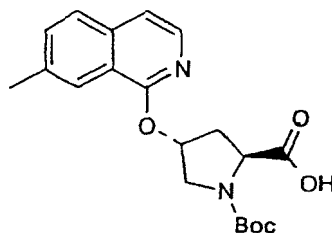


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 2,58 (s, 3 H), 7,56 (m, 2 H), 7,73 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 8,20 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 178.

Etapla 3

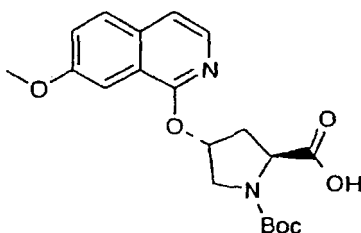
Modificaciones: se usaron 205 mg de 1-cloro-7-metil-isoquinolina, se obtuvieron 350 mg de producto (89% de rendimiento).

Producto:



Datos: EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 373.

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

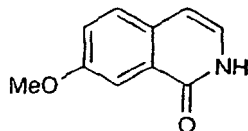


ES 2 320 771 T3

Etapla 1

Modificaciones: se usaron 33 g de ácido 4-metoxicinnámico, se obtuvieron 7 g del producto (33% de rendimiento).

Producto:

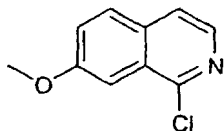


Datos: ^1H RMN (500 MHz, CD_3COCD_3) δ ppm 3,90 (s, 3 H), 6,49 (d, $J = 7,0$ Hz, 1 H), 7,10 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,28 (dd, $J = 8,6, 2,8$ Hz, 1 H), 7,57 (d, $J = 8,9$ Hz, 1 H), 7,71 (d, $J = 2,8$ Hz, 1 H).

Etapla 2

Modificaciones: se usaron 4 g de 7-metoxi-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 3 g del producto (68% de rendimiento).

Producto:

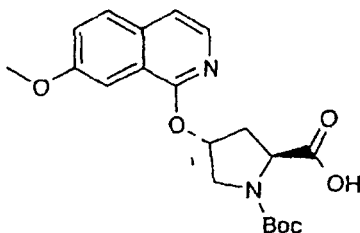


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3,98 (s, 3 H), 7,38 (dd, $J = 8,9, 2,6$ Hz, 1 H), 7,52 (m, 2 H), 7,73 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H), 8,16 (d, $J = 5,4$ Hz, 1 H).

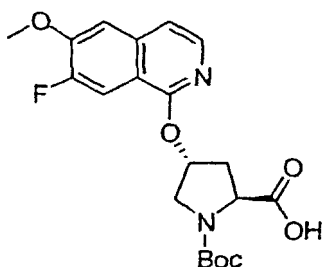
Etapla 3

Modificaciones: se usaron 533 mg de 1-cloro-7-metoxi-isoquinolina, se obtuvieron 1115 mg del producto (100% de rendimiento).

Producto:



Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

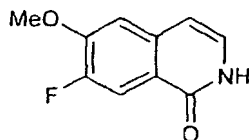


ES 2 320 771 T3

Etapa 1

Modificaciones: se usaron 19,6 g de ácido 4-fluoro-3-metoxicinnámico, se obtuvieron 9,5 g del producto (48% de rendimiento).

Producto:

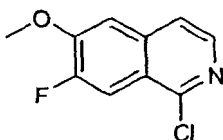


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3COCD_3) δ ppm 4,00 (s, 1 H), 6,49 (d, $J = 7,34$ Hz, 1 H), 7,19 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 7,29 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H), 7,86 (d, $J = 11,74$ Hz, 1 H).

Etapa 2

Modificaciones: se usaron 9 g de 7-fluoro-6-metoxi-2*H*-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 7 g del producto (70% de rendimiento).

Producto:

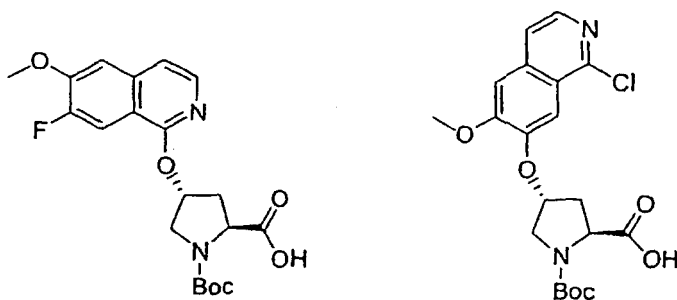


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4,04 (s, 3 H), 7,17 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H), 7,48 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H), 7,94 (d, $J = 11,49$ Hz, 1 H), 8,20 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H).

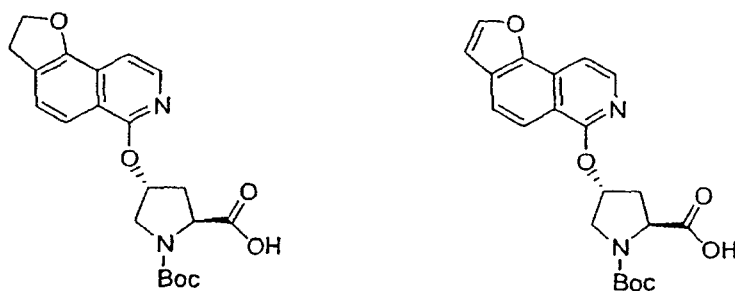
Etapa 3

Modificaciones: se usaron 222 mg de 1-cloro-7-fluoro-6-metoxi-isoquinolina, se obtuvieron 406 mg del producto.

Productos:



Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

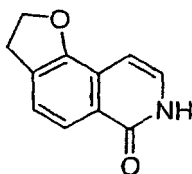


ES 2 320 771 T3

Etapla 1

Modificaciones: se usaron 3,8 g de ácido 3-(2,3-dihidro-benzofuran-7-il)-acrílico, se obtuvieron 2 g del producto (53% de rendimiento).

Producto:

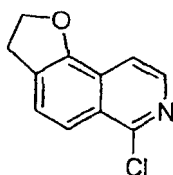


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3,37 (t, $J = 9,05$ Hz, 1 H), 4,73 (t, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 6,67 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 7,10 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 7,37 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H), 7,81 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 188.

Etapla 2

Modificaciones: se usaron 1,87 g de 2,3-dihidro-7H-furo[2,3-f]isoquinolin-6-ona, se obtuvieron 1,84 g del producto (90% de rendimiento).

Producto:

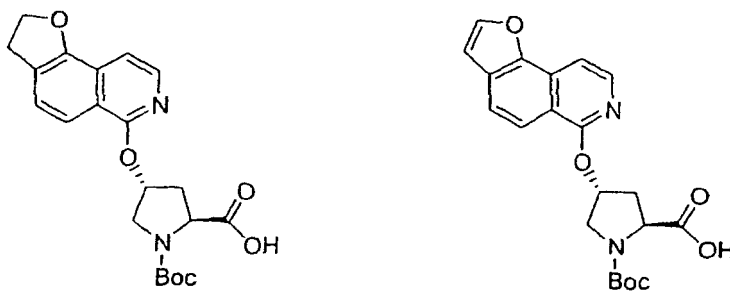


Datos: ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3) δ ppm 3,43 (t, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 4,82 (t, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 7,52 (d, $J = 8,56$ Hz, 1 H), 7,66 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H), 7,84 (d, $J = 8,31$ Hz, 1 H), 8,19 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H); EM $(\text{M}+\text{H})^+$ 206.

Etapla 3

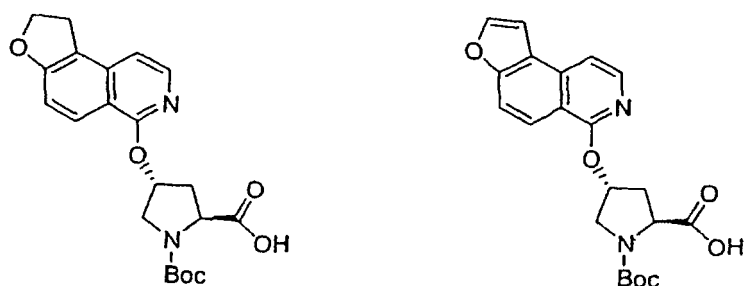
Modificaciones: se usaron 206 mg de 6-cloro-2,3-dihidro-furo[2,3-f]isoquinolina, se obtuvo una mezcla de 300 de los productos.

Productos:



ES 2 320 771 T3

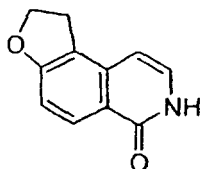
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapa 1

Modificaciones: se usaron 1,14 g de ácido 3-(2,3-dihidro-benzofuran-4-il)-acrílico, se obtuvieron 600 mg de producto (52% de rendimiento).

Producto:

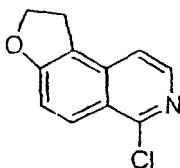


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3,35 (t, $J = 8,93$ Hz, 2 H), 4,74 (t, $J = 8,93$ Hz, 2 H), 6,49 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 6,95 (d, $J = 8,56$ Hz, 1 H), 7,25 (d, $J = 7,09$ Hz, 1 H), 8,13 (d, $J = 8,80$ Hz, 1 H); EM (M+H) $^+$ 188.

Etapa 2

Modificaciones: se usaron 560 mg de 1,7-dihidro-2H-furo[3,2-f]isoquinolin-6-ona, se obtuvieron 380 mg de producto (48% de rendimiento).

Producto:



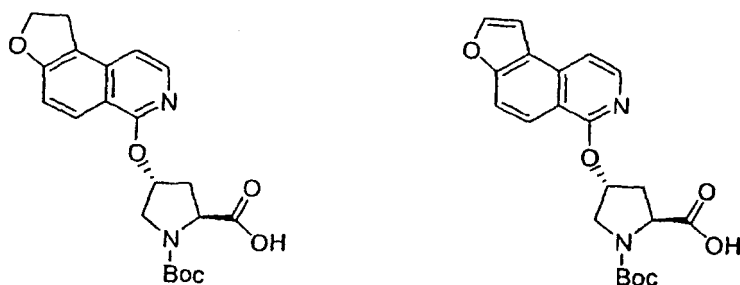
Datos: ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3) δ ppm 3,47 (t, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 4,84 (t, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 7,24 (d, $J = 8,56$ Hz, 1 H), 7,33 (d, $J = 5,87$ Hz, 1 H), 8,20 (m, 2 H); EM (M+H) $^+$ 206.

Etapa 3

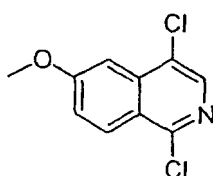
Modificaciones: se usaron 105 mg de 6-cloro-1,2-dihidro-furo[3,2-f]isoquinolina, se obtuvo una mezcla de 390 de los productos.

ES 2 320 771 T3

Productos:



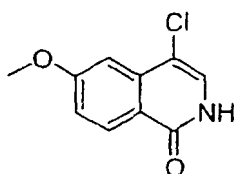
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Etapa 1

Modificaciones: Una mezcla de 6-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona (700 mg) y NCS (532 mg) en MeCN (10 ml) se calentó a reflujo durante 3 h. La filtración dio 600 mg (72%) del producto deseado en forma de un sólido.

Producto:

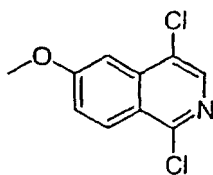


Datos: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3,96 (s, 1 H), 7,19 (dd, $J = 8,80, 2,45$ Hz, 1 H), 7,28 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,34 (s, 1 H), 8,25 (d, $J = 9,05$ Hz, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 210.

Etapa 2

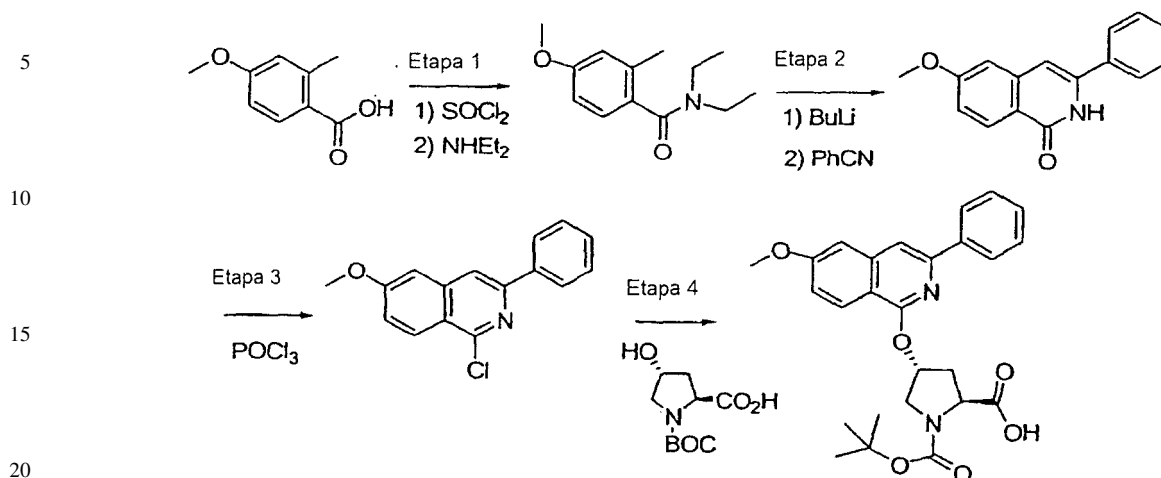
Modificaciones: se usaron 500 mg de 4-cloro-6-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona, se obtuvieron 400 mg del producto.

Producto:



Datos: ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3) δ ppm 4,01 (s, 3 H), 7,35 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,41 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 8,24 (d, $J = 9,29$ Hz, 1 H), 8,27 (s, 1 H); EM: $(\text{M}+\text{H})^+$ 229.

Procedimiento B



Etapa 1

Una mezcla de ácido 4-metoxi-2-metil-benzoico (5,00 g, 30,1 mmol) y cloruro de tionilo (20,0 g, 0,17 mol) se calentó a reflujo durante 30 min. El volátil se retiró al vacío. Después de bombear durante una noche, el aceite viscoso cloruro de ácido se usó en bruto para la siguiente reacción sin purificación.

A una solución de cloruro de 4-metoxi-2-metil-benzoilo en CH_2Cl_2 (60 ml) a 0°C se le añadió gota a gota dietilamina. La mezcla formada se dejó calentar a la temperatura ambiente durante 2 h con agitación. Los volátiles se retiraron al vacío. El residuo se trituró con EtOAc (100 ml) y se filtró. El filtrado se lavó con HCl 1 M, NaOH 1 M y salmuera y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente produjo 6,51 g (98%) del producto deseado en forma de un aceite viscoso. CL-EM (tiempo de retención: 1,20 min, procedimiento B), EM m/z 222 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Etapa 2

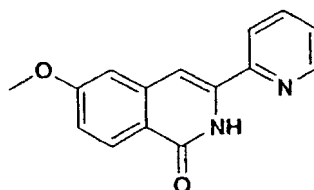
A una solución de N,N-dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (221 mg, 1,0 mmol) en THF (2 ml) a -78°C se le añadió gota a gota n-BuLi (0,84 ml de 2,5 M en hexano, 2,10 mmol). La solución de color naranja formada se mantuvo a esta temperatura durante 30 min más antes de la adición gota a gota de benzonitrilo (103 mg, 1,0 mmol). La solución final se dejó calentar a la temperatura ambiente durante una noche con agitación. Se inactivó con ácido cítrico al 5% enfriado con hielo. Se filtró, se lavó con agua y se secó. La trituración con 2:1 de hexano-EtOAc (5 ml) produjo 205 mg (82%) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (d_6 -DMSO) δ 3,89 (s, 3H), 6,84 (s, 1H), 7,05-7,07 (m, 1H), 7,18 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,44-7,51 (m, 3H), 7,78 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,20 min, procedimiento B), EM m/z 252 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Etapa 3

Este producto, 1-cloro-6-metoxi-3-fenil-isoquinolina, se preparó por el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente con la excepción de que se usó 6-metoxi-3-fenil-2H-isoquinolin-1-ona.

^1H RMN (CDCl_3) δ 3,97 (s, 3H), 7,12 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,23-7,26 (m, 1H), 7,40-7,42 (m, 1H), 7,46-7,50 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 8,08 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 8,21 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,90 min, procedimiento B), EM m/z 270, 271 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



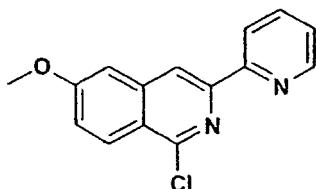
A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 1,3 ml, 2,25 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió 2-cianopiridina (156 mg, 1,5 mmol). Después, la mezcla de reacción se calentó a

ES 2 320 771 T3

ta y se agitó durante una noche. La reacción se interrumpió con una solución saturada de NH_4Cl y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4) y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC Prep. para dar un sólido de color amarillento en forma de la sal TFA. (85 mg, 15% de rendimiento).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 3,91 (m, 3 H), 7,09 (dd, $J = 9,05, 2,45$ Hz, 1 H), 7,17 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,37 (s, 1 H), 7,42 (m, 1 H), 7,92 (m, 1 H), 8,08 (d, $J = 8,07$ Hz, 1 H), 8,18 (d, $J = 9,05$ Hz, 1 H), 8,65 (d, $J = 4,89$ Hz, 1 H). CL-EM (tiempo de retención: 2,14 min.), EM m/z 253 (MH^+).

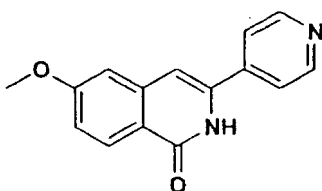
Etapas 2 (Esquema 3, Etapa 1)



Se calentó a reflujo sal TFA de 6-metoxi-3-piridin-2-il-2H-isoquinolin-1-ona (85 mg, 0,232 mmol) con POCl_3 (3,0 ml) durante 2 días. Después, el POCl_3 se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución 10 N de NaOH y el sólido de color pardo se recogió en forma de un producto puro. (62 mg, 99% de rendimiento).

CL-EM (tiempo de retención: 2,063 min.), EM m/z 271 (MH^+).

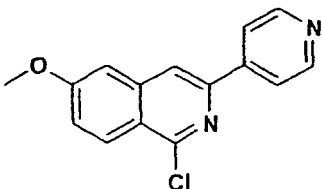
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 1,3 ml, 2,25 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió 4-cianopiridina (164 mg, 1,575 mmol). Después, la mezcla de reacción se calentó a 0°C y se agitó durante una noche. La reacción se interrumpió con una solución saturada de NH_4Cl y el precipitado de color amarillo se recogió en forma de un producto puro. (145 mg, 38% de rendimiento).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 3,91 (s, 3 H), 7,18 (dd, $J = 8,8$ Hz, 2,8 Hz, 1 H), 7,26 (m, 2 H), 8,06 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 8,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 8,84 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H). CL-EM (tiempo de retención: 1,300 min.), EM m/z 253 (MH^+).

Etapas 2 (Esquema 3, etapa 1):



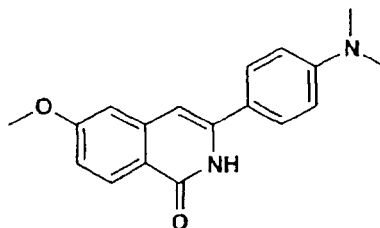
Se calentó a reflujo 6-Metoxi-3-piridin-4-il-2H-isoquinolin-1-ona (134 mg, 0,531 mmol) con POCl_3 (6,0 ml) durante 5 días. Después, el POCl_3 se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución saturada de NaHCO_3 y el sólido de color pardo se recogió en forma de un producto puro. (125 mg, 87% de rendimiento).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 3,99 (s, 3 H), 7,53 (dd, $J = 9,04$ Hz, 2,44 Hz, 1 H), 7,59 (d, $J = 2,69$ Hz, 1 H), 8,26 (d, $J = 9,05$ Hz, 1 H), 8,30 (d, $J = 5,38$ Hz, 2 H), 8,73 (s, 1 H), 8,85 (d, $J = 6,36$ Hz, 2 H).

CL-EM (tiempo de retención: 2,027 min.), EM m/z 271 (MH^+).

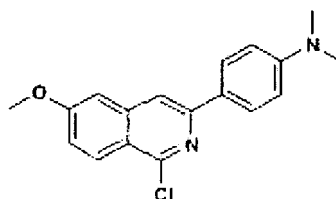
ES 2 320 771 T3

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 1,3 ml, 2,25 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió 4-dimetilamino benzonitrilo (219 mg, 1,5 mmol). Después, la mezcla de reacción se calentó a ta y se agitó durante una noche. La reacción se interrumpió con una solución saturada de NH_4Cl y el precipitado de color amarillo se recogió y se trituro con éter para dar un sólido de color blanquecino en forma de un producto puro. (247 mg, 56% de rendimiento).

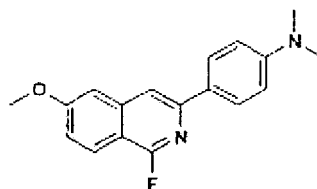
^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 2,97 (s, 6 H), 3,87 (s, 3 H), 6,72 (s, 1 H), 6,78 (d, $J = 8,80$ Hz, 2 H), 6,97 (dd, $J = 8,80$, 2,45 Hz, 1 H), 7,10 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,65 (d, $J = 8,80$ Hz, 2 H), 8,05 (d, $J = 8,80$ Hz, 1 H), 11,11 (s, 1 H). CL-EM (tiempo de retención: 2,023 min.), EM m/z 295 (MH^+).



Se calentó a reflujo 3-(4-Dimetilamino-fenil)-6-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona (245 mg, 0,83 mmol) con POCl_3 (10,0 ml) durante 2 días. Después, el POCl_3 se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución 10 N de NaOH y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron (MgSO_4). La evaporación del disolvente dio un sólido de color naranja como producto (215 mg, 83% de rendimiento).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 3,01 (s, 6 H), 3,96 (s, 3 H), 6,88 (d, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 7,20 (dd, $J = 9,17$, 2,57 Hz, 1 H), 7,28 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,94 (s, 1 H), 7,96 (d, $J = 9,05$ Hz, 2 H), 8,13 (d, $J = 9,29$ Hz, 1 H).

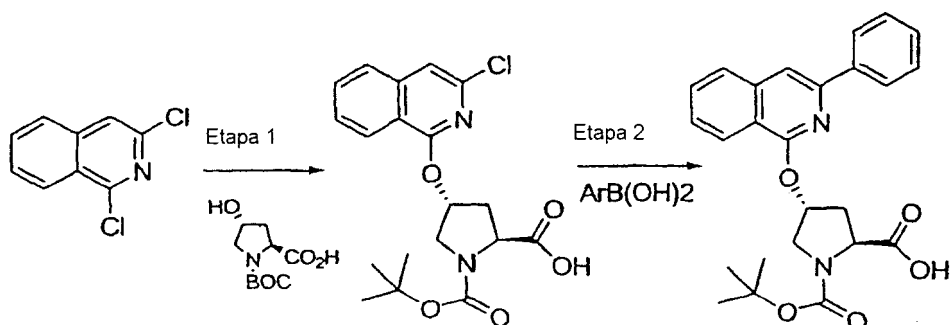
CL-EM (tiempo de retención: 2,543 min.), EM m/z 313 (MH^+).



Una mezcla de [4-(1-Cloro-6-metoxi-isoquinolin-3-il)-fenil]-dimetil-amina (110 mg, 0,35 mmol) e hidrogenodifluoruro de tetrabutilfosfonio (0,5 g) se calentó a 140°C en un reactor de microondas Smith durante 20 min. Después, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y se secó (MgSO_4). La evaporación del disolvente dio un sólido de color parduzco como producto. (85 mg, 82% de rendimiento).

CL-EM (tiempo de retención: 2,320 min.), EM m/z 297 (MH^+).

Procedimiento C



Etapa 1

A una solución de N-BOC-3(R)-hidroxi-L-prolina (6,22 g, 26,9 mmol) en DMF (250 ml) a 0°C se le añadió en varias porciones NaH (al 60%, 3,23 g, 80,8 mmol). La suspensión formada se agitó a esta temperatura durante 30 min. Se añadió 1,3-dicloro-isoquinolina (5,33 g, 26,9 mmol) en forma de un sólido en una porción y la mezcla final se agitó a la temperatura ambiente durante 12 h. Se inactivó con ácido cítrico al 5% enfriado con hielo (ac.) y se extrajo con EtOAc (300 ml). La fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con ácido cítrico al 5% (ac.) y salmuera respectivamente, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. El filtrado se evaporó al vacío a sequedad para producir 10,53 g (99,8%) de 1-terc-butil éster del ácido 4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1,2-dicarboxílico en forma de una espuma de color blanquecino. Este material se usó en la siguiente etapa de reacción en bruto sin purificación adicional.

¹H RMN (CD₃OD) δ 1,43, 1,44 (rotámeros, 9H), 2,39-2,44 (m, 1H), 2,68-2,72 (m, 1H), 3,80-3,90 (m, 2H), 4,44-4,52 (m, 1H), 5,77 (a, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,58 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,71-7,78 (m, 2H), 8,16 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H);

CL-EM (tiempo de retención: 1,80 min, procedimiento B), EM *m/z* 392 (M⁺+H).

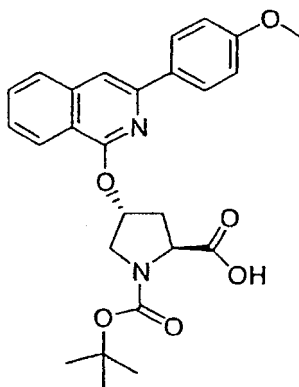
Etapa 2

Una mezcla de 1-terc-butil éster del ácido 4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (39 mg, 0,10 mmol), ácido fenilborónico (14,6 mg, 0,12 mmol), terc-butoxido sódico (38 mg, 0,40 mmol) y ((*t*-Bu)₂POH)₂PdCl₂ (POPd) (5 mg, 0,01 mmol) en THF (2 ml) se calentó a reflujo durante 4 h. Después de enfriar, la mezcla formada se inactivó con ácido cítrico al 5% (ac.) y se extrajo con EtOAc (20 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por HPLC prep. para producir 36 mg (83%) del producto deseado en forma de una espuma de color blanquecino.

¹H RMN (CD₃OD) δ 1,43, 1,45 (rotámeros, 9H), 2,51-2,56 (m, 1H), 2,74-2,82 (m, 1H), 3,88-3,92 (m, 1H), 3,98-4,01 (m, 1H), 4,50-4,57 (m, 1H), 5,95 (a, 1H), 7,36-7,39 (m, 1H), 7,45-7,48 (m, 2H), 7,55 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,70 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,84-7,89 (m, 2H), 8,14-8,17 (m, 3H), 9,05 (a, 1H);

CL-EM (tiempo de retención: 1,97 min, procedimiento B), EM *m/z* 435 (M⁺+H).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

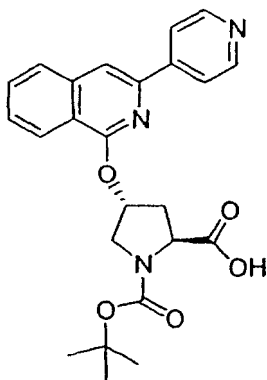


ES 2 320 771 T3

Preparado usando ácido 4-metoxifenilborónico

¹H RMN (CD₃OD) δ 1,40, 1,45 (rotámetros, 9H), 2,50-2,55 (m, 1H), 2,73-2,81 (m, 1H), 3,81-3,89 (m, 4H), 3,98-4,01 (m, 1H), 4,50-4,57 (m, 1H), 5,93 (a, 1H), 7,02 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,50 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,67 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 8,15 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 2,00 min, procedimiento B), EM *m/z* 465 (M⁺+H).

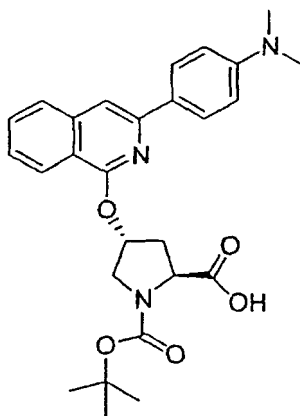
El siguiente intermedio se preparó como se ha descrito anteriormente:



Preparado usando ácido 4-piridilborónico

¹H RMN (CD₃OD) δ 1,43, 1,46 (rotámetros, 9H), 2,53-2,56 (m, 1H), 2,80-2,89 (m, 1H), 3,90-3,93 (m, 1H), 4,00-4,05 (m, 1H), 4,50-4,57 (m, 1H), 6,00, 6,05 (rotámetros, 1H), 7,80 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,87 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 8,32 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,84 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 8,84 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H); CL-EM (tiempo de retención: 1,39 min, procedimiento B), EM *m/z* 436 (M⁺+H).

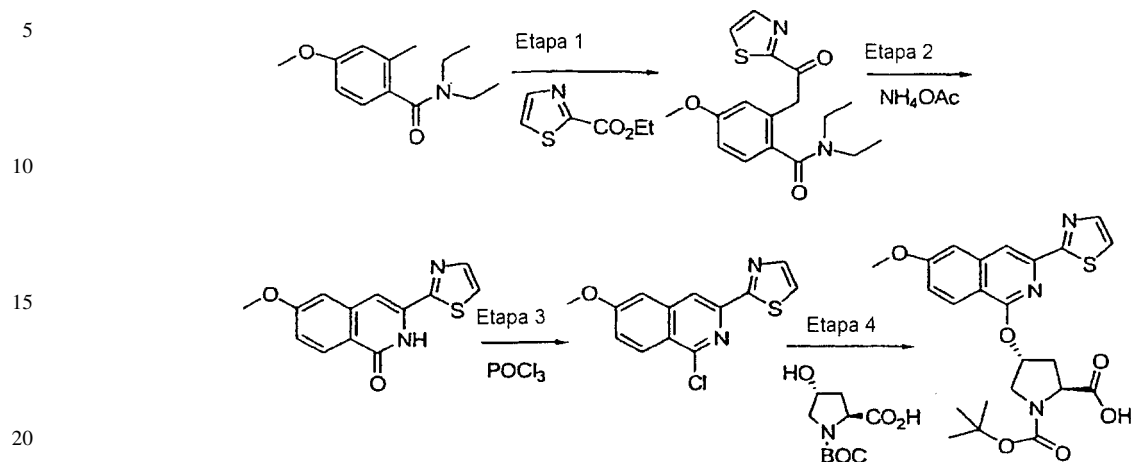
Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Preparado usando ácido 4-N,N-dimetilamino-fenilborónico

CL-EM (tiempo de retención: 1,64 min, procedimiento B), EM *m/z* 478 (M⁺+H).

Procedimiento D



Etapa 1

A una solución de N,N-diethyl-4-metoxi-2-metil-benzamida (633 mg, 2,9 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió gota a gota n-BuLi (2,3 ml de 2,5 M en hexano, 5,74 mmol). La solución de color rojo formada se mantuvo a esta temperatura durante 30 min más antes de canularse a una solución de éster etílico del ácido tiazol-2-carboxílico (A. Medici y col., Tetrahedron Lett. 1983, p2901) (450 mg, 2,9 mmol) en THF (5 ml) a -78°C . La solución final de color verde oscuro se mantuvo a esta temperatura durante 2 h con agitación. Se inactivó con NH_4Cl sat. (ac.) y se extrajo con EtOAc (50 ml). La fase orgánica se lavó con NH_4Cl sat. (ac.) y salmuera, se secó y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con 2:1 de EtOAc:hexano para proporcionar 405 mg (45%) del producto deseado en forma de un aceite viscoso de color blanquecino.

^1H RMN (CDCl_3) δ 1,08 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H), 3,22 (a, 2H), 3,44 (a, 2H), 3,79 (s, 3H), 4,59 (s, 2H), 6,79-6,81 (m, 1H), 6,86 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,66 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,30 min, procedimiento B), EM m/z 333 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Etapa 2

Una mezcla de N,N-diethyl-4-metoxi-2-(2-oxo-2-tiazol-2-il-etil)-benzamida (405 mg, 1,22 mmol) y NH_4OAc (3,0 g, 38,9 mmol) se calentó a 140°C en un tubo cerrado herméticamente durante 1 h. La solución fundida se vertió en agua enfriada con hielo, se filtró y la torta se lavó minuciosamente con agua. El sólido secado de color parduzco (240 mg, 76%) se usó en bruto para la siguiente reacción sin purificación adicional. CL-EM (tiempo de retención: 1,24 min, procedimiento B), EM m/z 259 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Etapa 3

Este producto, 1-cloro-6-metoxi-3-tiazol-2-il-isoquinolina, se preparó como se ha descrito anteriormente con la excepción de que se usó 6-metoxi-3-tiazol-2-il-2H-isoquinolin-1-ona.

^1H RMN (CDCl_3) δ 3,97 (s, 3H), 7,16 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,27-7,31 (m, 1H), 7,46 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 8,22 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 8,39 (s, 1H);

CL-EM (tiempo de retención: 1,66 min, procedimiento B), EM m/z 277 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

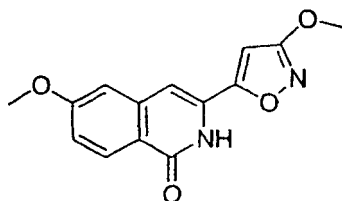
Etapa 4

Este producto se preparó por el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente con la excepción de que se usó 1-cloro-6-metoxi-3-tiazol-2-il-isoquinolina.

^1H RMN (CD_3OD) δ 0,97-1,09 (m, 12H), 1,24-1,29 (m, 10H), 1,44-1,46 (m, 1H), 1,87-1,90 (m, 1H), 2,20-2,26 (m, 1H), 2,30-2,36 (m, 1H), 2,65-2,71 (m, 1H), 2,93-2,96 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 4,12-4,27 (m, 2H), 4,38-4,52 (m, 2H), 5,12 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 5,29 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H), 5,69-5,74 (m, 1H), 5,99 (a, 1H), 7,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,66 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,11 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 9,14 (a, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,89 min, procedimiento B), EM m/z 797 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

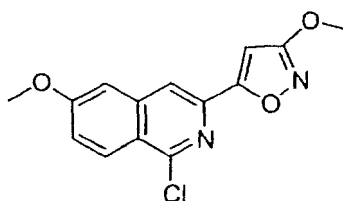
ES 2 320 771 T3

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Se preparó 6-metoxi-3-(3-metoxi-isoxazol-5-il)-2H-isoquinolin-1-ona usando N,N-dietil-4-metoxi-2-[2-(3-metoxi-isoxazol-5-il)-2-oxo-etil]-benzamida.

^1H RMN (DMSO-d_6) δ 3,89 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 7,01 (s, 1H), 7,14-7,16 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 8,13 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); CL-EM (tiempo de retención: 1,31 min, procedimiento B), EM m/z 273 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

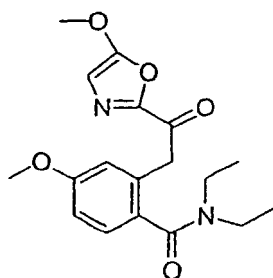


Se preparó 1-cloro-6-metoxi-3-(3-metoxi-isoxazol-5-il)-isoquinolina usando 6-metoxi-3-(3-metoxi-isoxazol-5-il)-2H-isoquinolin-1-ona.

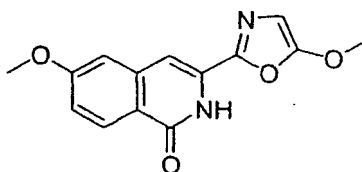
^1H RMN (CDCl_3) δ 3,97 (s, 3H), 4,04 (s, 3H), 6,60 (s, 1H), 7,17 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,31-7,33 (m, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,23 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H);

CL-EM (tiempo de retención: 1,73 min, procedimiento B), EM m/z 291, 293 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



Se preparó N,N-dietil-4-metoxi-2-[2-(5-metoxi-oxazol-2-il)-2-oxo-etil]-benzamida usando éster etílico del ácido 5-metoxi-oxazol-2-carboxílico CL-EM (tiempo de retención: 1,24 min, procedimiento B), EM m/z 347 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

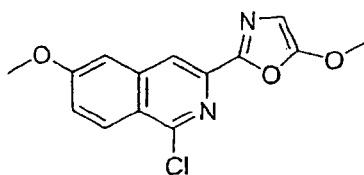


Se preparó 6-metoxi-3-(5-metoxi-oxazol-2-il)-2H-isoquinolin-1-ona usando N,N-dietil-4-metoxi-2-[2-(5-metoxi-oxazol-2-il)-2-oxo-etil]-benzamida.

^1H RMN (DMSO-d_6) δ 3,94 (s, 3H), 4,01 (s, 3H), 6,34 (s, 1H), 6,99 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,12-7,14 (m, 1H), 7,25 (s, 1H), 8,32 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H);

CL-EM (tiempo de retención: 1,22 min, procedimiento B), EM m/z 274 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

ES 2 320 771 T3

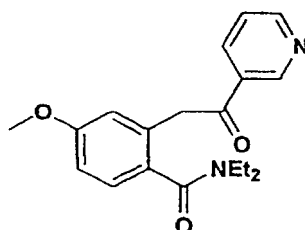


Se preparó 1-cloro-6-metoxi-3-(5-metoxi-oxazol-2-il)-isoquinolina usando 6-metoxi-3-(5-metoxi-oxazol-2-il)-2H-isoquinolin-1-ona.

^1H RMN (CDCl_3) δ 3,96 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 6,34 (s, 1H), 7,12 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,28-7,31 (m, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,23 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H);

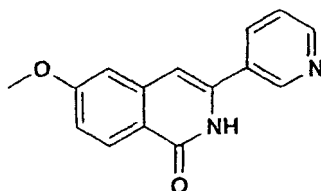
CL-EM (tiempo de retención: 1,58 min, procedimiento B), EM m/z 291, 293 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1

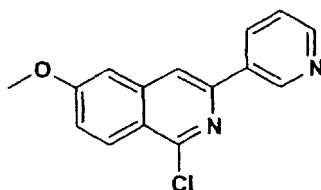


A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 2,12 ml, 3,6 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió nicotinato de metilo (206 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió con una solución saturada de NH_4Cl y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4) y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC Prep. para dar un aceite espeso de color amarillento en forma de la sal TFA. (124 mg, 19% de rendimiento).

CL-EM (tiempo de retención: 1,740 min.), EM m/z 349 ($\text{M} + \text{Na}^+$).



Se calentó N,N-Dietil-4-metoxi-2-(2-oxo-2-piridin-3-il-etil)-benzamida (120 mg, 0,272 mmol) con acetato de amonio (1 g) durante 3 h. Después, se enfrió y se añadió agua. Se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se separó. Después, se secó (MgSO_4) y se concentró para dar un sólido de color parduzco como producto. (65 mg, 95% de rendimiento) ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3,89 (s, 3 H), 6,93 (s, 1 H), 7,10 (dd, $J = 8,80, 2,45$ Hz, 1 H), 7,19 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H), 7,52 (dd, $J = 7,46, 4,77$ Hz, 1 H), 8,15 (m, 2 H), 8,64 (dd, $J = 4,89, 1,47$ Hz, 1 H), 8,96 (d, $J = 1,71$ Hz, 1 H), 11,51 (s, 1 H). CL-EM (tiempo de retención: 1,377 min.), EM m/z 253 (MH^+).

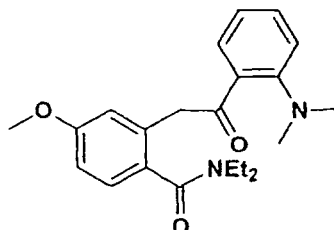


Se calentó a reflujo 6-Metoxi-3-piridin-3-il-2H-isoquinolin-1-ona (65 mg, 0,258 mmol) con POCl_3 (2,5 ml) durante 7 días. Después, el POCl_3 se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución 10 N de NaOH y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4) y se concentraron para dar un sólido de color amarillo como producto. (27 mg, 39% de rendimiento).

ES 2 320 771 T3

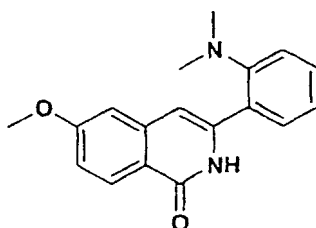
CL-EM (tiempo de retención: 2,090 min.), EM m/z 271 (MH⁺).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 2,2 ml, 3,75 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió éster metílico del ácido N,N-dimetilantranílico (269 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió con una solución saturada de NH₄Cl y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC Prep. para dar un aceite espeso de color amarillento como producto. (256 mg, 46% de rendimiento).

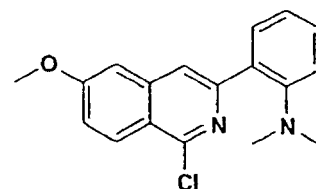
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 0,99-1,13 (m, 6 H), 3,23-3,31 (m, 8 H), 3,39 (m, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 4,35 (s, 2 H), 6,91 (dd, J = 8,44, 2,57 Hz, 1 H), 6,99 (d, J = 2,45 Hz, 1 H), 7,22 (d, J = 8,56 Hz, 1 H), 7,69 (t, J = 7,70 Hz, 1 H), 7,84 (m, 1 H), 7,96 (d, J = 8,31 Hz, 1 H), 8,18 (d, J = 7,83 Hz, 1 H). CL-EM (tiempo de retención: 1,557 min.), EM m/z 369 (MH⁺).



Se calentó 2-[2-(2-Dimetilamino-fenil)-2-oxo-etil]-N,N-dietil-4-metoxi-benzamida (250 mg, 0,678 mmol) con acetato de amonio (1,5 g) durante 2 h. Después, se enfrió y se añadió agua. Se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se separó. Después, se secó (MgSO₄) y se concentró para dar un sólido de color amarillento como producto. (125 mg, 63% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 2,95 (s, 6 H), 3,92 (s, 3 H), 6,92 (s, 1 H), 7,12 (dd, J = 8,80, 2,45 Hz, 1 H), 7,16 (d, J = 2,45 Hz, 1 H), 7,35 (m, 1 H), 7,55 (m, 2 H), 7,63 (d, J = 7,83 Hz, 1 H), 8,20 (d, J = 9,05 Hz, 1 H).

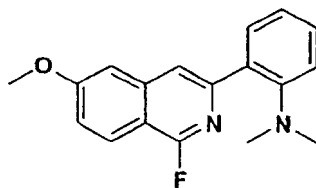
CL-EM (tiempo de retención: 2,097 min.), EM m/z 295 (MH⁺).



Se calentó a reflujo 3-(2-Dimetilamino-fenil)-6-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona (125 mg, 0,425 mmol) con POCl₃ (4,0 ml) durante un día. Después, el POCl₃ se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución 10 N de NaOH y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron (MgSO₄). La evaporación del disolvente dio un sólido de color parduzco como producto (82 mg, 62% de rendimiento).

ES 2 320 771 T3

CL-EM (tiempo de retención: 2,040 min.), EM m/z 313 (MH⁺).

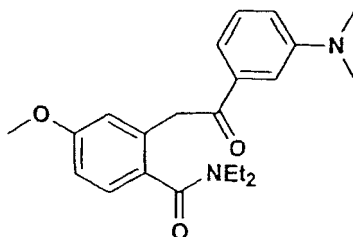


Una mezcla de [2-(1-Cloro-6-metoxi-isoquinolin-3-il)-fenil]-dimetil-amina (82 mg, 0,262 mmol) e hidrogenodifluoruro de tetrabutilfosfonio (1,0 g) se calentó a 140°C en un reactor de microondas Smith durante 20 min. Después, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y se secó (MgSO₄). La evaporación del disolvente dio el producto en bruto que se purificó por HPLC Prep. para producir un aceite de color amarillento como producto. (85 mg).

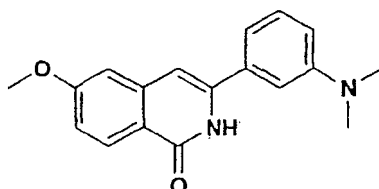
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 3,41 (s, 6 H), 4,00 (s, 3 H), 7,42 (dd, *J* = 9,05, 2,45 Hz, 1 H), 7,53 (s, 1 H), 7,71 (m, 2 H), 7,99 (m, 1 H), 8,16 (m, 2 H), 8,31 (s, 1 H).

CL-EM (tiempo de retención: 1,873 min.), EM m/z 297 (MH⁺).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



A una solución de N,N-Dietil-4-metoxi-2-metil-benzamida (332 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) a -78°C se le añadió t-BuLi (solución 1,7 M en pentano, 2,2 ml, 3,75 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó a -78°C durante 10 min y después se añadió éster metílico del ácido (3-dimetilamino)benzoico (269 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió con una solución saturada de NH₄Cl y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El producto en bruto se purificó por HPLC Prep. para dar un aceite espeso de color amarillento en forma de la sal TFA. (245 mg, 33% de rendimiento) ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,01 (t, *J* = 6,85 Hz, 3 H), 1,09 (m, 3 H), 3,11 (s, 6H), 3,21 (m, 2 H), 3,40 (m, 2 H), 3,79 (s, 3 H), 4,39 (s, 2 H), 6,84-6,91 (m, 2 H), 7,19 (d, *J* = 8,32 Hz, 1 H), 7,35 (m, 1 H), 7,49 (t, *J* = 8,07 Hz, 1 H), 7,66-7,71 (m, 2 H). CL-EM (tiempo de retención: 1,930 min.), EM m/z 369 (MH⁺).

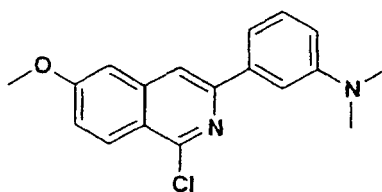


Se calentó 2-[2-(3-Dimetilamino-fenil)-2-oxo-etil]-N,N-dietil-4-metoxi-benzamida (240 mg, 0,497 mmol) con acetato de amonio (2,0 g) durante 2,5 h. Después, se enfrió y se añadió agua. A sólido de color parduzco se recogió en forma del producto puro. (95 mg, 65% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 2,98 (s, 6 H), 3,88 (s, 3 H), 6,74-6,87 (m, 2 H), 7,01-7,07 (m, 3 H), 7,18 (d, *J* = 2,44 Hz, 1 H), 7,28 (t, *J* = 7,82 Hz, 1 H), 8,10 (d, *J* = 8,80 Hz, 1 H).

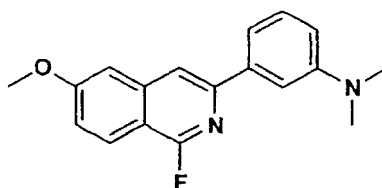
CL-EM (tiempo de retención: 1,773 min.), EM m/z 295 (MH⁺).

ES 2 320 771 T3



Se calentó a reflujo 3-(3-Dimetilamino-fenil)-6-metoxi-2H-isoquinolin-1-ona (92 mg, 0,312 mmol) con POCl_3 (3,0 ml) durante 2 días. Después, el POCl_3 se retiró por destilación y el residuo se inactivó con hielo. Después, se neutralizó con una solución saturada de NaHCO_3 y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron (MgSO_4). La evaporación del disolvente dio un aceite espeso de color parduzco como producto. (72 mg, 74% de rendimiento).

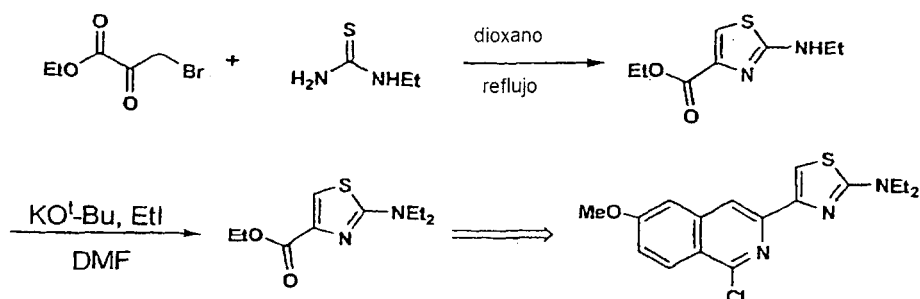
CL-EM (tiempo de retención: 2,297 min.), EM m/z 313 (MH^+).



Una mezcla de [3-(1-Cloro-6-metoxi-isoquinolin-3-il)-fenil]-dimetilamina (72 mg, 0,23 mmol) y hidrogenodifluoruro de tetrabutilfosfonio (0,5 g) se calentó a 140°C en un reactor de microondas Smith durante 20 min. Después, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y se secó (MgSO_4). La evaporación del disolvente dio un aceite de color parduzco como producto. (58 mg, 85% de rendimiento).

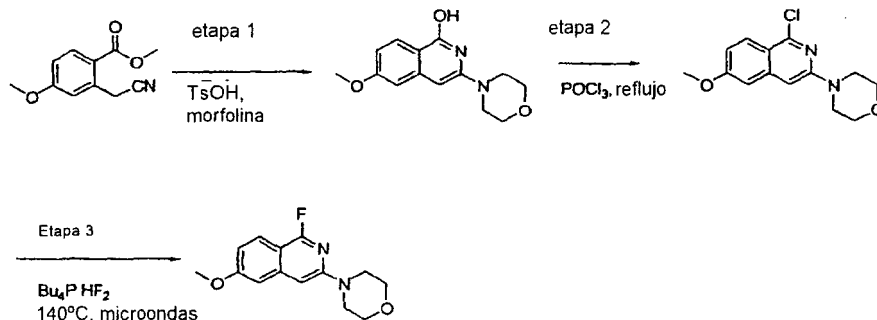
CL-EM (tiempo de retención: 2,193 min.), EM m/z 297 (MH^+).

Los siguientes intermedios se prepararon como se ha descrito en este documento y pueden incorporarse en compuestos de Fórmula 1



La condensación de bromopiruvato de etilo con etil tiourea en dioxano a la temperatura de reflujo produjo el monoalquilamino tiazol en forma de la sal HBr con rendimiento cuantitativo. La alquilación de éster etílico del ácido 2-etilamino-tiazol-4-carboxílico con EtI en DMF proporcionó éster etílico del ácido 2-dietilamino-tiazol-4-carboxílico. CL/EM m/z 229 (MH^+).

Procedimiento E



ES 2 320 771 T3

Etapa 1

Una suspensión de éster metílico del ácido 2-cianometil-4-metoxi-benzoico (1,9 g y TsOH·H₂O (0,15 g, mmol) en morfolina 5 ml) se calentó a reflujo durante 4 h y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se recrystalizó en EtOAc/hexanos con gotas de MeOH para proporcionar el producto (0,43 g, 17%): CL-EM tiempo de retención: 1,07 procedimiento H), EM *m/z* 266 (M⁺+1).

Etapa 2

Una mezcla de 6-metoxi-3-morfolin-4-il-isoquinolin-1-ol (0,298 g, 1,15 mmol) en POCl₃ (20 ml) se calentó a reflujo durante 2 h, el disolvente se retiró al vacío y se añadió agua fría. El pH se ajustó a >11 mediante la adición de NaOH 1,0 N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc. El extracto se secó (MgSO₄) y el disolvente se retiró al vacío para proporcionar el producto (0,299 g, 94%): CL-EM tiempo de retención: 1,68 procedimiento H), EM *m/z* 279 (M⁺+1).

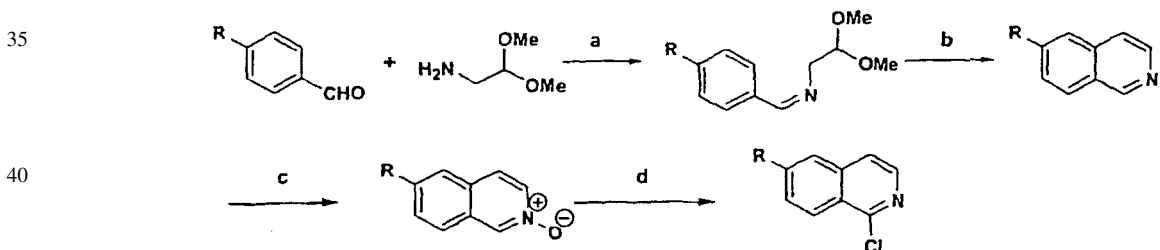
Etapa 3

Una mezcla de 1-Cloro-6-metoxi-3-morfolin-4-il-isoquinolina (0,050 g, 0,18 mmol) e hidrogenodifluoruro de tetrabutilfosfonio (0,8 g, 2,8 mmol) [Synlett 1992, (4), 345-6] se calentó a 140°C en el microondas durante 10 min. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se filtró a través de una precolumna ISCO de 25 g con una capa de gel de silicio en la parte superior, y el disolvente se retiró para proporcionar el producto (0,037 mg, 77%): ¹H RMN (CLOROFORMO-D) δ ppm 3,48 (m, 4 H), 3,84 (m, 4 H), 3,89 (s, 3 H), 6,46 (d, *J* = 1,22 Hz, 1 H), 6,85 (s, 1 H), 6,90 (dd, *J* = 9,16, 2,44 Hz, 1 H), 7,82 (d, *J* = 8,85 Hz, 1 H). CL-EM tiempo de retención: 1,56 procedimiento H), EM *m/z* 263 (M⁺+1).

Procedimiento F

Se prepararon 6-fluoro y 6-alkil isoquinolinas en la preparación de compuestos de Fórmula 1 mediante una síntesis de Pomeranz-Fritsch (Procedimiento típico: Preparación de 1,1-biisoquinolina 8,8-disustituida ópticamente activa, K. Hirao, R. Tsuchiya, Y. Yano, H. Tsue, Heterocycles 42(1) 1996, 415-422) como se indica a continuación. Los productos se convirtieron en los derivados de 1-cloro mediante intermedios de N-óxido.

Esquema Sintético General



Reactivos y condiciones de reacción: (a) calentamiento a reflujo en benceno, retirada azeotrópica del agua; (b) primera etapa: cloroformato de etilo, fosfito de trimetilo en THF, segunda etapa: tetracloruro de titanio en cloroformo; (c) MCPBA en CH₂Cl₂; (d) POCl₃ en benceno

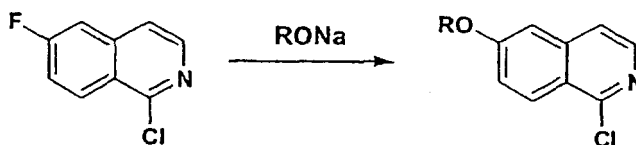
R	Isoquinolina, Rendimiento	1-Cloruro, rendimiento combinado
F	20	43
Et	76	65
i-Pr	14	18
t-Bu	47	55

Preparación de intermedios de 6-isopropoxil y 6-*terc*-butoxil isoquinolina

Algunas 6-alcóxi-1-cloro isoquinolinas se prepararon por un desplazamiento ipso directo de la 6-fluoro-1-cloroisoquinolina con los iones metálicos de alcóxido correspondientes tales como *terc*-butóxido potásico (al 53%) e isopropóxido sódico (al 54%).

ES 2 320 771 T3

Esquema Sintético General

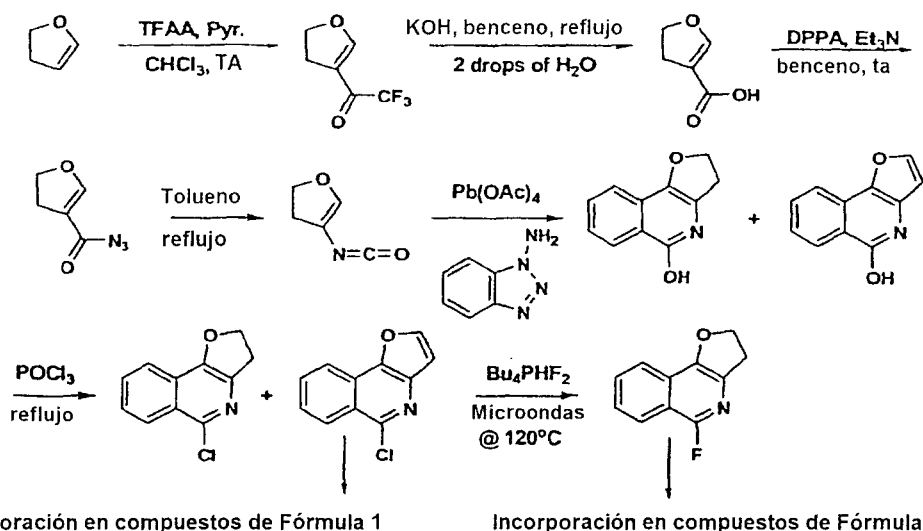


R = aniones de alcóxido tales como *tert*-Bu, iso-Pr

La 6-fluoro-1-cloroisoquinolina se sometió a un desplazamiento nucleófilo aromático con isopropóxido sódico y *tert*-butóxido potásico en DMF para dar las 6-isopropoxil (al 54%): ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 1,43 (d, $J = 6,11$ Hz, 6 H) 4,76 (m, $J = 6,11$ Hz, 1 H) 7,08 (d, $J = 2,45$ Hz, 1 H) 7,29 (dd, $J = 9,29, 2,45$ Hz, 1 H) 7,50 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H) 8,18 (d, $J = 5,87$ Hz, 1 H) 8,24 (d, $J = 9,29$ Hz, 1 H) y 6-*tert*-butoxil-1-cloro isoquinolinas correspondientes (al 55%): ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 1,48 (s, 9 H) 7,31 (m, 2 H) 7,47 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H) 8,18 (d, $J = 5,62$ Hz, 1 H) 8,21 (d, $J = 9,78$ Hz, 1 H) como producto principal, respectivamente. Estas 6-alcóxil-1-cloro isoquinolinas se incorporaron en compuestos de Fórmula 1 como se describe en este documento.

Procedimiento G

Esquema Sintético General



Incorporación en compuestos de Fórmula 1

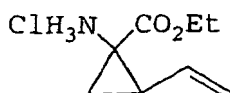
Incorporación en compuestos de Fórmula 1

Esta síntesis hace uso de las tecnologías descritas, en parte, en las siguientes referencias:

- (1) Hojo, Masaru; Masuda, Ryoichi; Sakaguchi, Syuhei; Takagawa, Makoto, *Synthesis* (1986), (12), 1016-17
- (2) Rigby, James H.; Holsworth, Daniel D.; James, Kelly. Vinyl Isocyanates In Synthesis. [4 + 2] Cycloaddition Reactions With Benzyne Addends. *Journal Of Organic Chemistry* (1989), 54(17), 4019-20
- (3) Uchibori, Y.; Umeno, M.; Yoshiokai, H.; *Heterocycles*, 1992, 34 (8), 1507-1510.

Etapa 1d

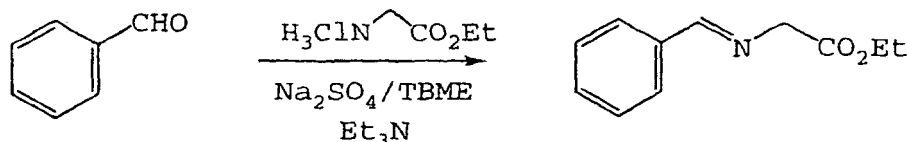
Preparación de clorhidrato de éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (Procedimiento A y Procedimiento B) y resolución quiral de este racemato para la preparación de clorhidrato de éster etílico del ácido *N*-(1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico (Procedimiento C)



El compuesto nombrado se hizo (Etapa d) racémico por cada uno de los siguientes procedimientos A y B. Este racemato también puede resolverse para producir éster del ácido Boc-(1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropilcarboxílico quiral que se desprotegió en condiciones ácidas para producir clorhidrato de éster del ácido (1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropano (Procedimiento C).

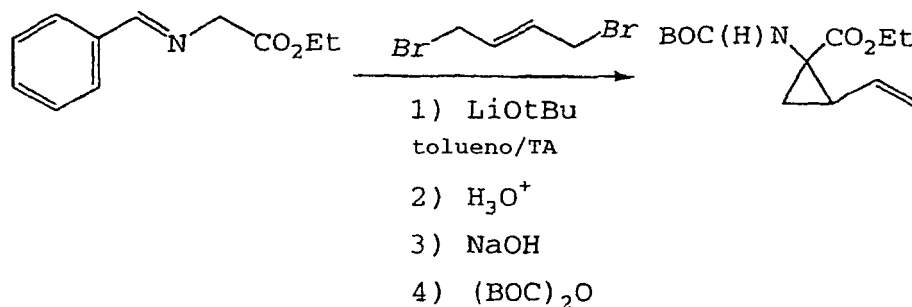
Procedimiento A

A.1 Preparación de *N*-Bencil Imina de Éster Etilico de Glicina



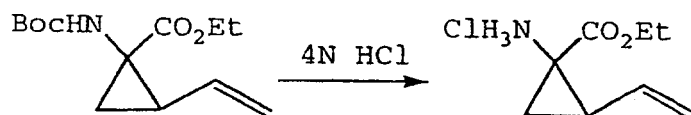
Se suspendió clorhidrato de éster etílico de glicina (303,8 g, 2,16 mol) en *tert*-butilmetil éter (1,6 l). Se añadieron benzaldehído (231 g, 2,16 mol) y sulfato sódico anhidro (154,6 g, 1,09 mol) y la mezcla se enfrió a 0°C usando un baño de hielo-agua. Se añadió gota a gota trietilamina (455 ml, 3,26 mol) durante 30 min y la mezcla se agitó durante 48 h a ta. Después, la reacción se interrumpió mediante la adición de agua enfriada con hielo (1 l) y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con *tert*-butilmetil éter (0,5 l) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con una mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado (1 l) y salmuera (1 l). La solución se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir 392,4 g del producto de *N*-bencil imina en forma de un aceite espeso de color amarillo que se usó directamente en la siguiente etapa. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 4,24 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,41 (d, *J* = 1,1 Hz, 2H), 7,39-7,47 (m, 3H), 7,78-7,81 (m, 2H), 8,31 (s, 1H).

A.2 Preparación de éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico



A una suspensión de *tert*-butóxido de litio (84,06 g, 1,05 mol) en tolueno seco (1,2 l) se le añadió gota a gota una mezcla de la *N*-bencil imina de éster etílico de glicina (100,4 g, 0,526 mol) y *trans*-1,4-dibromo-2-buteno (107,0 g, 0,500 mol) en tolueno seco (0,6 l) durante 60 min. Después de que se completara la adición, la mezcla de color rojo oscuro se inactivó mediante la adición de agua (1 l) y *tert*-butilmetil éter (TBME, 1 l). La fase acuosa se separó y se extrajo una segunda vez con TBME (1 l). La fase orgánicas se combinaron, se añadió HCl 1 N (1 l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La fase orgánica se separó y se extrajo con agua (0,8 l). Las fases acuosas se combinaron, se saturaron con sal (700 g), se añadió TBME (1 l) y la mezcla se enfrió a 0°C. Después, la mezcla agitada se basificó a pH 14 mediante la adición gota a gota de NaOH 10 N, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con TBME (2 x 500 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron hasta un volumen de 1 l. A esta solución de amina libre se le añadió BOC₂O o dicarbonato de di-*tert*-butilo (131,0 g, 0,6 mol) y la mezcla se agitó 4 días a ta. A la reacción se le añadió más cantidad de dicarbonato de di-*tert*-butilo (50 g, 0,23 mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h y después se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir 80 g de material en bruto. Este residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (2,5 kg de SiO₂, eluyendo con MeOH del 1% al 2%/CH₂Cl₂) para producir 57 g (53%) de éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico en forma de un aceite de color amarillo que solidificó mientras reposaba en el frigorífico: ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,43-1,49 (m, 1H), 1,76-1,82 (m a, 1H), 2,14 (c, *J* = 8,6 Hz, 1H), 4,18 (c, *J* = 7,2 Hz, 2H), 5,12 (dd *J* = 10,3, 1,7 Hz, 1H), 5,25 (s a, 1H), 5,29 (dd, *J* = 17,6, 1,7 Hz, 1H), 5,77 (ddd, *J* = 17,6, 10,3, 8,9 Hz, 1H); EM *m/z* 254,16 (M-1).

A.3 Preparación de clorhidrato de éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*) 1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico

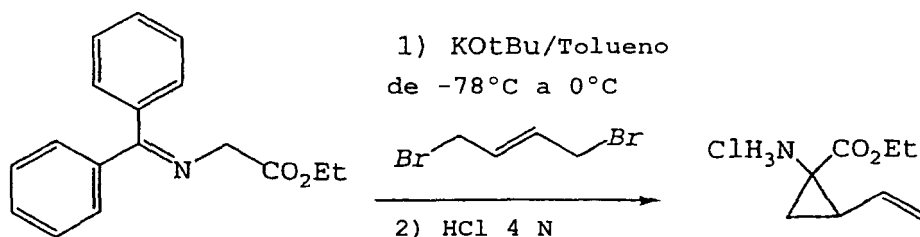


ES 2 320 771 T3

Se disolvió éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico (9,39 g, 36,8 mmol) en HCl 4 N/dioxano (90 ml, 360 mmol) y se agitó durante 2 h a ta. La mezcla de reacción se concentró para suministrar clorhidrato de éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico con rendimiento cuantitativo (7 g, 100%). ¹H RMN (metanol-*d*₄) δ 1,32 (t, *J* = 7,1, 3H), 1,72 (dd, *J* = 10,2, 6,6 Hz, 1H), 1,81 (dd, *J* = 8,3, 6,6 Hz, 1H), 2,38 (c, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,26-4,34 (m, 2H), 5,24 (dd, 10,3, 1,3 Hz, 1H) 5,40 (d, *J* = 17,2, 1H), 5,69-5,81 (m, 1H).

Procedimiento B

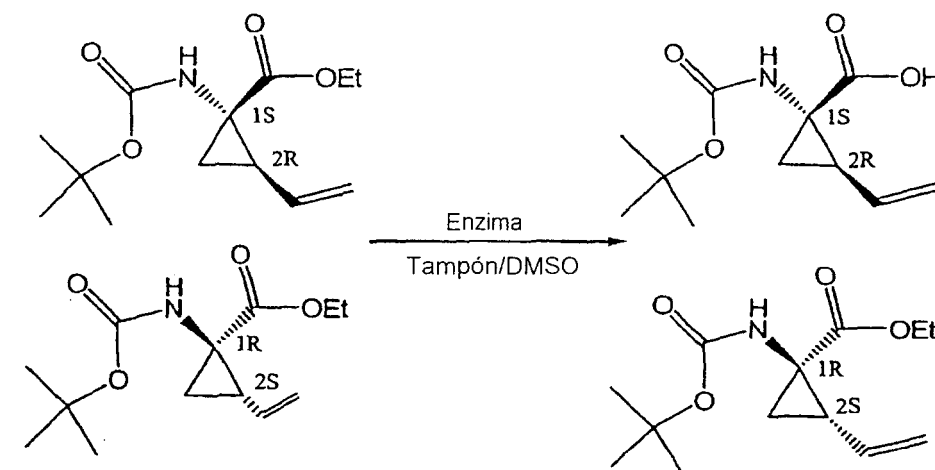
B.1 Preparación de clorhidrato de éster etílico del ácido *N*-Boc-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico



A una solución de *tert*-butoxido potásico (11,55 g, 102,9 mmol) en THF (450 ml) a -78°C se le añadió la *N,N*-dibencil imina disponible en el mercado de éster etílico de glicina (25,0 g, 93,53 mmol) en THF (112 ml). La mezcla de reacción se calentó a 0°C, se agitó durante 40 min y después se enfrió de nuevo a -78°C. A esta solución se le añadió *trans*-1,4-dibromo-2-butenó (20,0 g, 93,50 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a 0°C y se enfrió de nuevo a -78°C. Se añadió *tert*-butoxido potásico (11,55 g, 102,9 mmol) y la mezcla se calentó inmediatamente a 0°C y se agitó una hora más antes de concentrarse al vacío. El producto en bruto se recogió en Et₂O (530 ml), se añadió una solución ac. 1 N de HCl (106 ml, 106 mmol) y la mezcla bifásica resultante se agitó durante 3,5 h a ta. Las fases se separaron y la fase acuosa se lavó con Et₂O (2 x) y se basificó con una solución ac. saturada de NaHCO₃. La amina deseada se extrajo con Et₂O (3 x) y el extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para obtener la amina libre. Este material se trató con una solución 4 N de HCl en dioxano (100 ml, 400 mmol) y se concentró para producir clorhidrato de éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico en forma de un semisólido de color pardo (5,3 g, 34% de rendimiento) idéntico al material obtenido en el procedimiento A, con la excepción de la presencia de una pequeña impureza aromática no identificada (al 8%).

Procedimiento C

C.1 Resolución de éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico



racemato: mezcla 1:1 de (1*R*, 2*S*) y (1*S*, 2*R*)

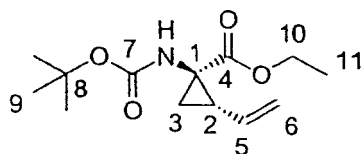
Resolución A

A una solución acuosa de tampón fosfato sódico (0,1 M, 4,25 litros ("l"), pH 8) en un reactor con camisa calefactora de 12 litros, mantenido a 39°C y agitado a 300 rpm se le añadieron 511 gramos de Alcalasa 2,4L (aproximadamente 425 ml) (Novozymes North America Inc.). Cuando la temperatura de la mezcla alcanzó 39°C, el pH se ajustó a 8,0 mediante la adición de NaOH al 50% en agua. Después, se añadió una solución del éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (85 g) en 850 ml de DMSO durante un periodo de 40 min. Después, la temperatura de reacción se mantuvo a 40°C durante 24,5 h, tiempo durante el cual el pH de la mezcla se ajustó a 8,0 en los puntos temporales 1,5 h y 19,5 h usando NaOH al 50% en agua. Después de 24,5 h, se

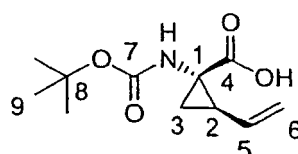
ES 2 320 771 T3

determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 97,2% y la reacción se enfrió a temperatura ambiente (26°C) y se agitó durante una noche (16 h), después de lo cual se determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 100%. Después, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5 con NaOH al y la mezcla resultante se extrajo con MTBE (2 x 2 l). Después, el extracto de MTBE combinado se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 100 ml) y agua (3 x 100 ml) y se evaporó al vacío para dar el éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinil-ciclopropanocarboxílico enantioméricamente puro en forma de un sólido de color amarillo claro (42,55 g; pureza: 97% @ 210 nm, que no contiene ácido; 100% de exceso enantiomérico ("ee").

Después, la fase acuosa del proceso de extracción se acidificó a pH 2 con H₂SO₄ al 50% y se extrajo con MTBE (2 x 2 l). El extracto de MTBE se lavó con agua (3 x 100 ml) y se evaporó para dar el ácido en forma de un sólido de color amarillo claro (42,74 g; pureza: 99% @ 210 nm, que no contiene éster).



1*R*,2*S*-éster



1*S*,2*R*-ácido

	éster		ácido	
Espec. de Masas de Alta Resolución	(+) ESI, C ₁₃ H ₂₂ NO ₄ , [M+H] ⁺ , cal. 256,1549, encontrado 256, 1542		(-) ESI, C ₁₁ H ₁₆ NO ₄ , [M-H] ⁻ , cal. 226,1079, encontrado 226,1089	
Cambio químico observado por RMN. Disolvente: CDCl ₃ (protón δ 7,24 ppm, C-13 δ 77,0 ppm) Bruker DRX-500C: protón 500,032 MHz, carbono 125,746 MHz.				
Posición	Protón (patrón) ppm	C-13 ppm	Protón (patrón) ppm	C-13 ppm
1	---	40,9	---	40,7
2	2,10' (c, <i>J</i> = 9,0 Hz)	34,1	2,17 (c, <i>J</i> = 9,0 Hz)	35,0
3a	1,76 (a)	23,2	1,79 (a)	23,4
3b	1,46 (a)		1,51, (a)	
4	----	170,8	---	175,8
5	5,74 (ddd, <i>J</i> = 9,0, 10,0, 17,0 Hz)	133,7	5,75 (m)	133,4
6a	5,25 (d, <i>J</i> = 17,0 Hz)	117,6	5,28 (d, <i>J</i> = 17,0 Hz)	118,1
6b	5,08 (dd, <i>J</i> = 10,0, 1,5 Hz)		5,12 (d, <i>J</i> = 10,5 Hz)	
7	---	155,8	---	156,2
8	---	80,0	---	80,6
9	1,43 (s)	28,3	1,43 (s)	28,3

ES 2 320 771 T3

10	4,16 (m)	61,3	---	---
11	1,23 (t, $J = 7,5$ Hz)	14,2	---	---

5

Resolución B

10 A 0,5 ml de tampón Heps·Na 100 mM (pH 8,5) en un pocillo de una placa de 24 pocillos (capacidad: 10 ml/pocillo) se le añadieron 0,1 ml de Savinase 16,0L (proteasa de *Bacillus clausii*) (Novozymes North America Inc.) y una solución del éster etílico del ácido N-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (10 mg) en 0,1 ml de DMSO. La placa se cerró herméticamente y se incubó a 250 rpm a 40°C. Después de 18 h, se determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 44,3% como se indica a continuación: se retiraron 0,1 ml de la mezcla de reacción y se mezclaron bien con 1 ml de etanol; después de la centrifugación, se analizaron 10 microlitros ("μl") del sobrenadante con la HPLC quiral. A la mezcla de reacción restante se le añadieron 0,1 ml de DMSO y la placa se incubó durante 3 días a 250 rpm a 40°C, después de lo cual se añadieron cuatro ml de etanol al pocillo. Después de la centrifugación, se analizaron 10 ml del sobrenadante con la HPLC quiral y se determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 100%.

20 Resolución C

25 A 0,5 ml de tampón Heps·Na 100 mM (pH 8,5) en un pocillo de una placa de 24 pocillos (capacidad: 10 ml/pocillo) se le añadieron 0,1 ml de Esperase 8,0L, (proteasa de *Bacillus halodurans*) (Novozymes North America Inc.) y una solución del éster etílico del ácido N-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (10 mg) en 0,1 ml de DMSO. La placa se cerró herméticamente y se incubó a 250 rpm a 40°C. Después de 18 horas, se determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 39,6% como se indica a continuación: se retiraron 0,1 ml de la mezcla de reacción y se mezclaron bien con 1 ml de etanol; después de la centrifugación, se analizaron 10 ml del sobrenadante con la HPLC quiral. A la mezcla de reacción restante se le añadieron 0,1 ml de DMSO y la placa se incubó durante 3 días más a 250 rpm a 40°C, después de lo cual se añadieron cuatro ml de etanol al pocillo. Después de la centrifugación, se analizaron 10 μl del sobrenadante con la HPLC quiral y se determinó que el exceso enantiomérico del éster era del 100%.

El análisis de las muestras se realizó de la siguiente manera:

35 1) Preparación de muestra: Se mezclaron bien aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción con 10 volúmenes de EtOH. Después de la centrifugación, se inyectaron 10 ml del sobrenadante sobre la columna de HPLC.

40 2) Determinación de la conversión:

Columna: YMC ODS A, 4,6 x 50 mm, S-5 μm

Disolvente: A, HCl 1 mM en agua; B, MeCN

45 Gradiente: 30% de B durante 1 min; de 30% a 45% de B durante 0,5 min; 45% de B durante 1,5 min; de 45% a 30% de B durante 0,5 min.

Caudal: 2 ml/min

Detección UV: 210 nm

50

Tiempo de retención: ácido, 1,2 min; éster, 2,8 min.

3) Determinación del exceso enantiomérico para el éster:

55 Columna: CHIRACEL OD-RH, 4,6 x 150 mm, S-5 μm

Fase móvil: MeCN/HClO₄ 50 mM en agua (67/33)

Caudal: 0,75 ml/min.

60

Detección UV: 210 nm.

Tiempo de retención:

65

ácido (1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico 5,2 min; Racemato éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico 18,5 min y 20,0 min; éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico 18,5 min.

Resolución D

Se mantuvieron 5 l de tampón fosfato sódico 0,3 M (pH 8) a 38°C en un reactor con camisa calefactora de 20 litros, agitado a 130 rpm. Al reactor se le añadieron cuatro litros de Alcalasa 2,4L (Novozymes North America Inc.) y 1 litro de agua DI. Cuando la temperatura de la mezcla alcanzó 38°C, el pH se ajustó a 7,8 con NaOH 10 N. Al reactor se le añadió una solución del éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (500 gramos) en 5 litros de DMSO durante un periodo de 1 hora mediante un embudo de adición. Después la temperatura de reacción se ajustó a 48°C. Después de 21 horas, el exceso enantiomérico del éster alcanzo el 99,3%. El calentamiento se interrumpió a las 24 horas y la reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y se agitó durante una noche. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5 con NaOH 10 N y la mezcla se extrajo con MTBE (2 x 4 l). El extracto de MTBE se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 400 ml) y agua (3 x 400 ml) y se evaporó para dar éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico enantioméricamente puro en forma de un cristal de color amarillo claro (259 g; pureza: 96,9% @ 210 nm, que no contiene ácido; 100% de ee).

Resolución E

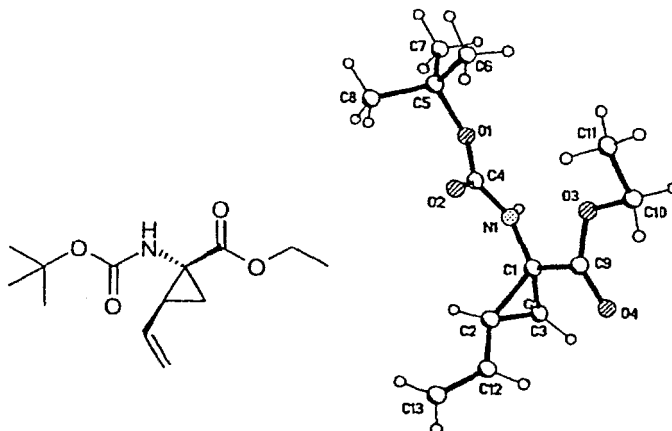
Se mantuvieron 10 l de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 8) a 40°C en un reactor con camisa calefactora de 20 litros y se agitó a 360 rpm. Al reactor se le añadieron 1,5 litros de Alcalasa 2,4L (Novozymes North America Inc.). Cuando la temperatura de la mezcla alcanzó 38°C, el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 10 N. Al reactor se le añadió una solución del éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (200 gramos) en 2 litros de DMSO durante un periodo de 1 hora mediante un embudo de adición. Después, la temperatura de reacción se ajustó a 40°C. Después de 3 horas, el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 10 N. Después de 21 horas, la reacción se enfrió a 25°C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5 con NaOH 10 N y la mezcla se extrajo con MTBE (2 x 5 l). El extracto de MTBE combinado se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 500 ml) y agua (3 x 200 ml) y se evaporó para dar 110 gramos de un aceite de color amarillo. El aceite se ajustó a temperatura ambiente al vacío y dio éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico enantioméricamente puro en forma de un cristal de varilla larga incoloro (101 g; pureza: 97,9% @ 210 nm, que no contiene ácido; 100% de ee).

La estructura cristalina de éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico enantioméricamente puro se ha caracterizado por análisis de cristal único (rayos X NB#: 52795-093, código de ref.: 634592N1). La configuración absoluta no se ha establecido por la carencia de un centro quiral conocido o de átomos más pesados. Se forma una estructura de cadena junto al eje *a* cristalográfico por unión de hidrógeno intermolecular entre el grupo amida y el átomo de oxígeno del carbonilo (N...O 3,159 Å).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 320 771 T3

Estructura de éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico



Datos de Cristal:

Fórmula química: C₁₃H₂₁N₁O₄

Sistema cristalino: Ortorrómbico

Grupo Espaciador: *P*2₁2₁

a = 5,2902(1) Å α = 90°

b = 13,8946(2) Å β = 90°

c = 19,9768(3) Å γ = 90°

V = 1468,40(4) Å³

Z = 4 d_x = 1,155 g cm⁻³

Nº de reflexiones para parámetros de la estructura cristalina: 6817

Experimental:

Cristalización

Fuente de cristal: MTBE

Descripción de cristal: varilla incolora

Tamaño de cristal (mm): 0,12 x 0,26 x 0,30

Colección de datos

Temperatura (K): 293

$\theta_{\max}$ (°): 65,2 (Cu K α)

Nº de reflexiones medidas: 7518

Nº de reflexiones independientes: 2390 (R_{int} = 0,0776)

$\theta_{\max}$ tanto para parámetros de estructura cristalina (°): 2,2-65,2

Coefficiente de absorción (mm⁻¹): 0,700

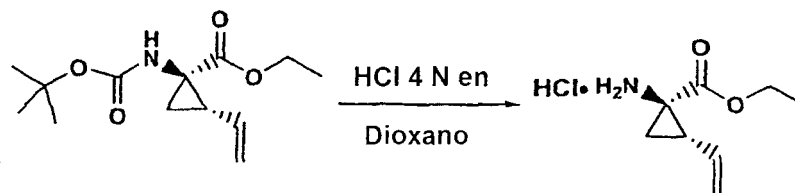
Nº de reflexiones observadas ($I \geq 2\sigma$): 2284

Corrección de absorción ($T_{\text{min}}-T_{\text{max}}$): 0,688-1,000

Resolución F

Se mantuvieron 5 l de tampón borato sódico 0,2 M (pH 9) a 45°C en un reactor con camisa calefactora de 20 litros y se agitó a 400 rpm. Al reactor se le añadieron tres litros de agua DI y cuatro litros de Savinase 16L, tipo EX (Novozymes North America Inc.). Cuando la temperatura de la mezcla alcanzó 45°C, el pH se ajustó a 8,5 con NaOH 10 N. Al reactor se le añadió una solución del éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico racémico (200 gramos) en 2 litros de DMSO durante un periodo de 40 min, mediante un embudo de adición. Después, la temperatura de reacción se ajustó a 48°C. Después de 2 horas, el pH se ajustó a pH 9,0 con NaOH 10 N. A las 18 horas, el exceso enantiomérico del éster alcanzó el 72% y el pH se ajustó a 9,0 con NaOH 10 N. A las 24 horas, la temperatura se disminuyó hasta 35°C. A las 42 horas, la temperatura se aumentó hasta 48°C y el pH se ajustó a 9,0 con NaOH 10 N. El calentamiento se interrumpió a las 48 horas y la reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y se agitó durante una noche. A las 66 horas, el pH de la mezcla de reacción era de 8,6. La mezcla se extrajo con MTBE (2 x 4 l). El extracto de MTBE combinado se lavó con NaHCO₃ al 5% (6 x 300 ml) y agua (3 x 300 ml) y se evaporó para dar éster etílico del ácido *N*-Boc-(1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico enantioméricamente puro en forma de un cristal de color amarillo claro (101A g; pureza: 95,9% @ 210 nm, que no contiene ácido; 98,6% de ee).

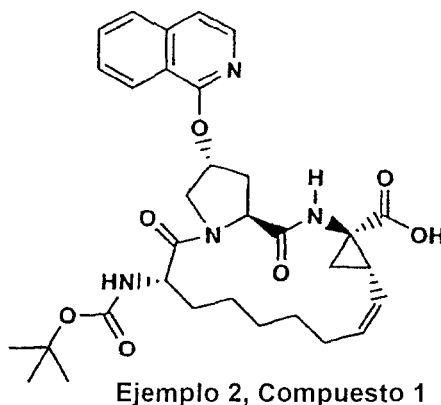
C.2 Preparación de clorhidrato de éster etílico del ácido (1R,2S)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico quiral



Se agitó éster etílico del ácido *N*-BOC-(1R,2S)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico (8,5 g, 33,3 mmol) en una atmósfera de N₂ con 200 ml de HCl 4 N/dioxano (Aldrich) a ta durante 3 h. El disolvente se retiró a presión reducida manteniendo la temperatura por debajo de 40 C. Esto dio 6,57 g (~100%) de clorhidrato de éster etílico del ácido (1R,2S)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico en forma de un sólido de color castaño claro. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 1,31 (t, *J* = 7,0 Hz, 3 H), 1,69-1,82 (m, 2 H), 2,38 (c, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 4,29 (c, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 5,22 (d, *J* = 10,3 Hz, 1 H), 5,40 (d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,69-5,81 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 0,58 min), EM *m/z* 156 (M⁺+1).

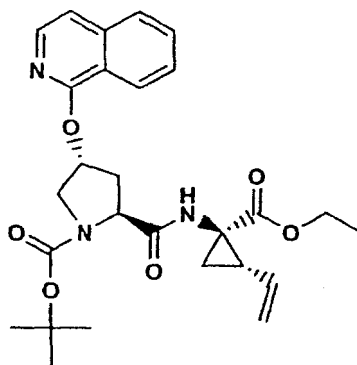
Ejemplo 2

Preparación del Compuesto 1, ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



Etapa 2A

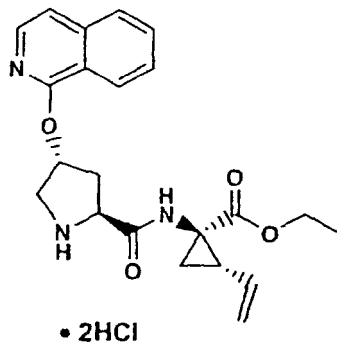
Preparación de éster terc-butilico del ácido 2-(1-etoxicarbonil-2-vinil-ciclopropilcarbamoil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1-carboxílico



Una suspensión agitada de 1-terc-butil éster del ácido 4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (5,69 g, 15,9 mmol) en 200 ml de cloruro de metileno se trató secuencialmente con diisopropiletilamina (13,8 ml, 79,0 mmol), HBTU (7,10 g, 18,7 mmol), HOBT·H₂O (2,86 g, 18,7 mmol) y clorhidrato de éster etílico del ácido 1R,2S-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico (3,19 g, 16,7 mmol). La solución homogénea de color dorado se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 18 h y después se concentró al vacío para dar 10 g de un aceite pardo. Éste se repartió entre acetato de etilo y NaHCO₃ ac. sat. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2-5% en cloruro de metileno) dio 5,5 g (70%) de éster terc-butilico del ácido 2-(1-etoxicarbonil-2-vinil-ciclopropilcarbamoil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1-carboxílico: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,42 min), EM *m/z* 496 (M⁺+1).

Etapa 2B

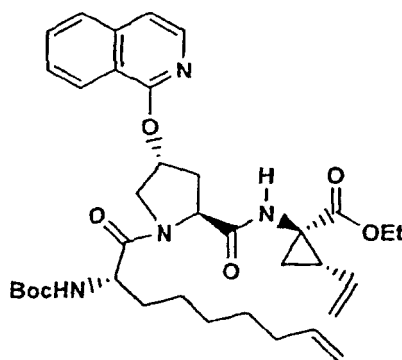
Preparación de éster etílico del ácido 1-{[4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinil-ciclopropanocarboxílico, bis clorhidrato



Una suspensión agitada de éster terc-butílico del ácido 2-(1-etoxicarbonil-2-vinil-ciclopropilcarbamoil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-1-carboxílico (5,40 g, 10,9 mmol) se trató con HCl 2 N/éter (Aldrich) (250 ml) durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío para dar 5,3 g (~100%) de éster etílico del ácido 1-{[4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinil-ciclopropanocarboxílico, bis clorhidrato en forma de un sólido de color blanco: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 2,40 min), EM m/z 396 ($M^+ + 1$).

Etapa 2C

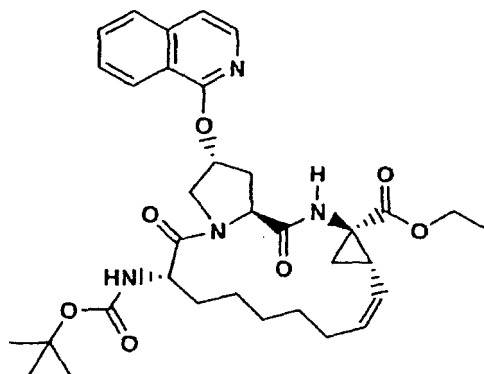
Preparación de éster etílico del ácido 1-{[-(2-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinilciclopropanocarboxílico



Se trató secuencialmente ácido 2(*S*)-terc-butoxicarbonilamino-8-nonenoico (adquirido en RSP Amino Acids) (1,0 g, 3,68 mmol) disuelto en 100 ml de DMF secuencialmente con éster etílico del ácido 1-{[4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinilciclopropanocarboxílico, bis clorhidrato (1,46 g, 3,68 mmol), N-metil morfolina (1,4 ml, 12,9 mmol) y HATU (PE biosystems) (1,68 g, 4,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N_2 durante 24 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4 (biftalato). La fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat., se secó ($MgSO_4$) y se concentró al vacío para dar 2,2 g del producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al 20-50%/hexano) dio 1,9 g (79%) de éster etílico del ácido 1-{[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinil-ciclopropanocarboxílico en forma de un sólido incoloro vidrioso: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,72 min), EM m/z 649 ($M^+ + 1$).

Etapa 2D

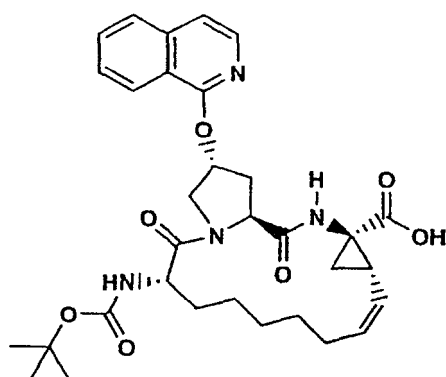
Preparación de éster etílico del ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



Una solución de éster etílico del ácido (1-{[1-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enil)-4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-vinilciclopropanocarboxílico 1,72 g, 2,65 mmol) y dicloruro de triciclohexilfosfina [1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno][bencilideno]rutenio (IV) (Strem) (225 mg, 0,265 mmol) en 650 ml de cloruro de metileno se calentó a reflujo en una atmósfera de N₂. La solución homogénea de color naranja claro se calentó a reflujo durante 24 h para dar una solución de color naranja oscuro. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se concentró al vacío para dar 1,7 g de un aceite de color naranja. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al 20-40%/hexano) dio 1,4 g (85%) de éster etílico del ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃Cl₃) δ 1,29 (t, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 1,34 (s, 9 H), 1,35-1,71 (m, 9 H), 1,86-1,97 (m, 2 H), 2,08-2,27 (m, 2 H), 2,38-2,47 (m, 1 H), 2,96-3,04 (m, 1 H), 4,02-4,23 (m, 4 H), 4,55 (m, 1 H), 4,91 (dd, *J* = 8,4 Hz, 4,0 Hz, 1 H), 5,25 (t, *J* = 9,5 Hz, 1 H), 5,32 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 5,50 (m, 1 H), 5,81 (m, 1 H), 6,96 (s, 1 H), 7,23 (m, 1 H), 7,51 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,65 (t, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,73 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,93 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 8,17 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,52 min), EM *m/z* 621 (M⁺+1).

Etapa 2E

Preparación del Compuesto 1, ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[4,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



Compuesto 1

Se disolvió éster etílico del ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (1,10 g, 1,77 mmol) en el sistema disolvente mixto; THF (18 ml), metanol (8 ml) y agua (2 ml). Se añadió hidróxido de litio hidrato en polvo (744 mg, 17,7 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 24 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 4 N hasta que el pH fue de 4. Esta solución ácida se extrajo cuatro veces con éter. Los extractos de éter combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 0,95 g (90%) de ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃Cl₃) δ 1,30 (s, 9 H), 1,34-1,46 (m, 4 H), 1,52-1,68 (m, 2 H), 1,84 (m, 2 H), 2,08-2,58 (m, 6 H), 2,78-2,87 (m, 1 H), 4,07 (m, 1 H), 4,32 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H), 4,41 (m, 1 H), 4,79 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 5,14 (t, *J* = 9,5 Hz, 1

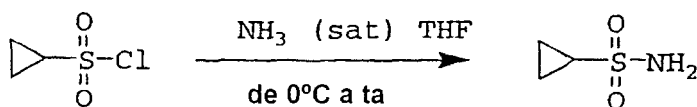
ES 2 320 771 T3

H), 5,23 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 5,60 (c, $J = 8,8$ Hz, 1 H), 5,86 (s, 1 H), 7,08 (s, 1 H), 7,22 (d, $J = 6,2$ Hz, 1 H), 7,48 (t, $J = 7,7$ Hz, 1 H), 7,64 (t, $J = 8,0$ Hz, 1 H), 7,72 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H), 7,94 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H), 8,17 (s, $J = 8,4$ Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,32 min), EM m/z 593 ($M^+ + 1$).

5 Ejemplo 3a

Preparación de Ciclopropilsulfonamida

Procedimiento A

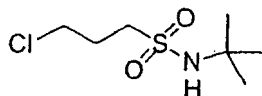


Una solución de 100 ml de THF enfriada a 0°C se burbujeó en amoníaco gaseoso hasta que se alcanzó la saturación. A esta solución se le añadió una solución de 5 g (28,45 mmol) de cloruro de ciclopropilsulfonilo (adquirido en Array Biopharma) en 50 ml de THF y la solución se calentó a ta durante una noche y se agitó durante un día más. La mezcla se concentró hasta que quedaron 1-2 ml de disolvente y se aplicó a un lecho de 30 g de SiO_2 (eluyendo con EtOAc del 30% al 60%/Hexanos) para producir 3,45 g (100%) de ciclopropil sulfonamida en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (Metanol- d_4) δ 0,94-1,07 (m, 4H), 2,52-2,60 (m, 1H); ^{13}C RMN (metanol- d_4) δ 5,92, 33,01.

Procedimiento B

Etapa 1

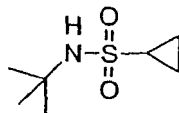
Preparación de N-terc-Butil-(3-cloro)propilsulfonamida



Se disolvió terc-butilamina (3,0 mol, 315,3 ml) se disolvió en THY (2,5 l). La solución se enfrió a -20°C. Se añadió lentamente cloruro de 3-cloropropanosulfonilo (1,5 mol, 182,4 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y se agitó durante 24 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (2,0 l). La solución resultante se lavó con HCl 1 N (1,0 l), agua (1,0 l) y salmuera (1,0 l) y se secó sobre Na_2SO_4 . Se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido de color ligeramente amarillo, que se cristalizó en hexano para producir el producto en forma de un sólido de color blanco (316,0 g, 99%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,38 (s, 9H), 2,30-2,27 (m, 2H), 3,22 (t, $J = 7,35$ Hz, 2H), 3,68 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 4,35 (a, 1H).

Etapa 2

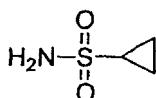
Preparación de terc-butilamida del ácido ciclopropanosulfónico



A una solución de N-terc-butil-(3-cloro)propilsulfonamida (2,14 g, 10,0 mmol) en THF (100 ml) se le añadió n-BuLi (2,5 M en hexano, 8,0 ml, 20,0 mmol) a -78°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante un periodo de 1 h. Los volátiles se retiraron al vacío. El residuo se repartió entre EtOAc y agua (200 ml, 200 ml). La fase orgánica separada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El residuo se recrystalizó en hexano para producir el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (1,0 g, 56%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,98-1,00 (m, 2H), 1,18-1,19 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 2,48-2,51 (m, 1H), 4,19 (a, 1H).

Etapa 3

Preparación de ciclopropilsulfonamida



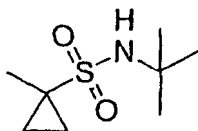
ES 2 320 771 T3

Una solución de *tert*-butilamida del ácido ciclopropanosulfónico (110,0 g, 0,62 mol) en TFA (500 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El volátil se retiró al vacío. El residuo se recrystalizó en EtOAc/hexano (60 ml/240 ml) para producir el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (68,5 g, 91%). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 0,84-0,88 (m, 2H), 0,95-0,98 (m, 2H), 2,41-2,58 (m, 1H), 6,56 (a, 2H).

Ejemplo 3b

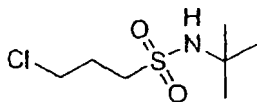
Preparación de ciclopropilsulfonamidas *CI*-sustituidas

Preparación de *N-tert*-butil-(1-metil)ciclopropil-sulfonamida



Etapa 1a

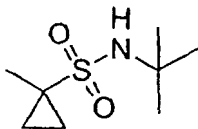
Preparación de *N-tert*-butil-(3-cloro)propil-sulfonamida



Como se ha mostrado anteriormente.

Etapa 1b

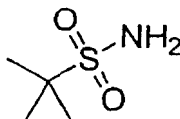
Preparación de *N-tert*-Butil-(1-metil)ciclopropil-sulfonamida



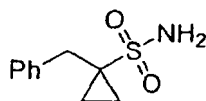
Una solución de *N-tert*-butil-(3-cloro)propil-sulfonamida (4,3 g, 20 mmol) se disolvió en THF seco (100 ml) y se enfrió a -78°C. A esta solución se le añadió lentamente *n*-BuLi (17,6 ml, 44 mmol, 2,5 M en hexano). El baño de hielo seco se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar a ta durante un periodo de 1,5 h. Después, esta mezcla se enfrió a -78°C y se añadió una solución de *n*-BuLi (20 mmol, 8 ml, 2,5 M en hexano). La mezcla de reacción se calentó a ta, se enfrió de nuevo a -78°C durante un periodo de 2 h y se añadió una solución pura de yoduro de metilo (5,68 g, 40 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a ta durante una noche, se inactivó con NH₄Cl saturado (100 ml) a ta. Se extrajo con EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (100 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar un aceite de color amarillo que se cristalizó en hexano para producir el producto en forma de un sólido de color ligeramente amarillo (3,1 g, 81%): ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,79 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,52 (m, 2H), 1,62 (s, 3H), 4,10 (s a, 1H).

Etapa 1c

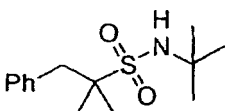
Preparación de 1-metilciclopropilsulfonamida



Una solución de *N-tert*-butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida (1,91 g, 10 mmol) se disolvió en TFA (30 ml) y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 16 h. El disolvente se retiró al vacío para dar un aceite de color amarillo que se cristalizó en EtOAc/hexano (1:4, 40 ml) para producir el Ejemplo 3, 1-metilciclopropilsulfonamida, en forma de un sólido de color blanco (1,25 g, 96%): ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,84 (m, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,58 (s, 3H), 4,65 (s a, 2H). Anál. calc. para C₄H₉NO₂S: C, 35,54; H, 6,71; N, 10,36, Encontrado: C, 35,67; H, 6,80; N, 10,40.

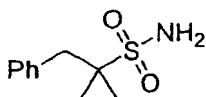
Preparación de 1-Bencilciclopropilsulfonamida

Etapas 1b

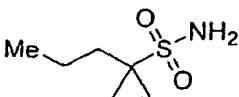
Preparación de N-terc-Butil-(1-bencil)ciclopropil-sulfonamida

Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 60% usando el procedimiento descrito para la síntesis de *N-terc*-butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida con la excepción de que se usaron 1,05 equivalentes de bromuro de bencilo, seguido de trituración con EtOAc al 10% en hexano: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,92 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 3,25 (s, 2H), 4,62 (s, 1H), 7,29-7,36 (m, 5H).

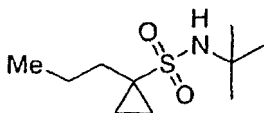
Etapas 1c

Preparación de 1-Bencilciclo-propilsulfonamida

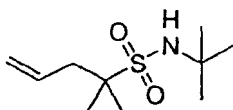
Este compuesto 1-bencilciclopropilsulfonamida se obtuvo con un rendimiento del 66% a partir de *N-terc*-butil(1-bencil)ciclo-propilsulfonamida usando el procedimiento descrito para la síntesis de 1-metilciclopropilsulfonamida, seguido de recristalización en la cantidad mínima de EtOAc al 10% en hexano: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,90 (m, 2H), 1,42 (m, 2 H), 3,25 (s, 2 H), 4,05 (s, 2 H), 7,29 (m, 3 H), 7,34 (m, 2 H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 11,1, 36,8, 41,9, 127,4, 128,8, 129,9, 136,5.

Preparación de 1-Propilciclopropilsulfonamida

Etapas 1b

Preparación de N-terc-Butil-(1-bencil)ciclopropil-sulfonamida

Este compuesto se preparó usando el procedimiento descrito para la preparación de 1-metilciclopropilsulfonamida con la excepción de que se utilizó haluro de propilo en lugar de yoduro de metilo en la segunda etapa de este procedimiento.

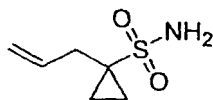
Preparación de N-terc-Butil-(1-alil)ciclopropilsulfonamida

ES 2 320 771 T3

Este compuesto, *N-terc*-Butil-(1-alil)ciclopropilsulfonamida, se obtuvo con un rendimiento del 97% de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis de *N-terc*-Butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida con la excepción de que se usaron 1,25 equivalentes de bromuro de alilo como electrófilo. El compuesto se recogió directamente en la siguiente reacción sin purificación: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,83 (m, 2H), 1,34 (s, 9H), 1,37 (m, 2H), 2,64 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 4,25 (s a, 1H), 5,07-5,10 (m, 2H), 6,70-6,85 (m, 1H).

Preparación de 1-alilciclopropilsulfonamida

10



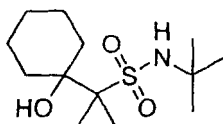
15

Este compuesto, 1-alilciclopropilsulfonamida, se obtuvo con un rendimiento del 40% a partir de *N-terc*-butil-(1-alil)ciclopropilsulfonamida de acuerdo con el procedimiento descrito en la síntesis de 1-Metilciclopropilsulfonamida. El compuesto se purificó por cromatografía en columna sobre SiO_2 usando MeOH al 2% en CH_2Cl_2 como eluyente: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,88 (m, 2 H), 1,37 (m, 2 H), 2,66 (d, $J = 7,0$ Hz, 2 H), 4,80 (s, 2 H), 5,16 (m, 2 H), 5,82 (m, 1 H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 11,2, 35,6, 40,7, 119,0, 133,6.

20

Preparación de *N-terc*-Butil-[1-(1-hidrox)ciclohexil]-ciclopropilsulfonamida

25



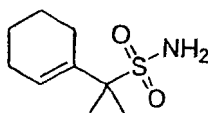
30

Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 84% usando el procedimiento descrito para la síntesis de *N-terc*-Butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida con la excepción de que se usaron 1,30 equivalentes de ciclohexanona, seguido de recristalización en la cantidad mínima de EtOAc al 20% en hexano: ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,05 (m, 4H), 1,26 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,57-1,59 (m, 6H), 1,97 (m, 2H), 2,87 (s a, 1H), 4,55 (s a, 1H).

35

Preparación de 1-(1-ciclohexenil)ciclopropil-sulfonamida

40



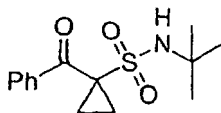
45

Este compuesto, 1-(1-ciclohexenil)-ciclopropilsulfonamida, se obtuvo con un rendimiento del 85% a partir de *N-terc*-butil-[1-(1-hidrox)ciclohexil]-ciclopropilsulfonamida usando el procedimiento descrito para la síntesis de 1-metilciclopropilsulfonamida, seguido de recristalización en la cantidad mínima de EtOAc y hexano: ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0,82 (m, 2 H), 1,28 (m, 2 H), 1,51 (m, 2 H), 1,55 (m, 2 H), 2,01 (s, 2 H), 2,16 (s, 2 H), 5,89 (s, 1 H), 6,46 (s, 2 H); ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 11,6, 21,5, 22,3, 25,0, 27,2, 46,9, 131,6, 132,2; EM-BR (ESI): 200 ($\text{M}^+ - 1$).

50

Preparación de *N-terc*-Butil-(1-benzoil)ciclopropil-sulfonamida

55

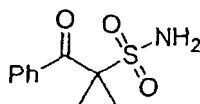


60

Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 66% usando el procedimiento descrito para la síntesis de *N-terc*-Butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida con la excepción de que se usaron 1,2 equivalentes de benzoato de metilo como electrófilo. El compuesto se purificó por cromatografía en columna sobre SiO_2 usando CH_2Cl_2 del 30% al 100% en hexano: ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,31 (s, 9H), 1,52 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 4,16 (s a, 1H), 7,46 (m, 2H), 7,57 (m, 1H), 8,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H).

Preparación de 1-benzoilciclo-propilsulfonamida

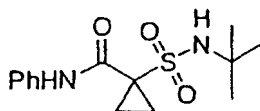
65



ES 2 320 771 T3

Este compuesto, 1-benzoilciclopropil-sulfonamida, se obtuvo con un rendimiento del 87% a partir de *N-terc*-butil (1-benzoil)ciclopropilsulfonamida usando el procedimiento descrito para la síntesis de 1-Metilciclopropilsulfonamida, seguido de recristalización en la cantidad mínima de EtOAc en hexano: ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1,39 (m, 2 H), 1,61 (m, 2 H), 7,22 (s, 2 H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H), 7,65 (t, $J = 7,6$ Hz, 1 H), 8,06 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 12,3, 48,4, 128,1, 130,0, 133,4, 135,3, 192,0.

Preparación de *N-terc*-Butil-(1-fenilaminocarboxi)-ciclopropilsulfonamida

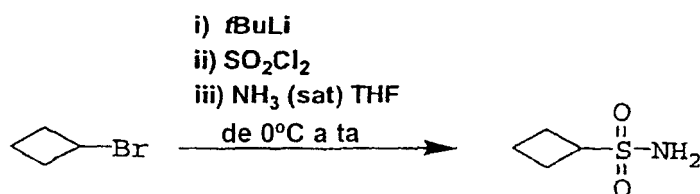


Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 42% usando el procedimiento descrito para la síntesis de *N-terc*-Butil-(1-metil)ciclopropilsulfonamida usando 1 equivalente de isocianato de fenilo, seguido de recristalización en la cantidad mínima de EtOAc en hexano ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,38 (s, 9H), 1,67-1,71 (m, 4H), 4,30 (s a, 1H), 7,10 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,34 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H).

Ejemplo 4

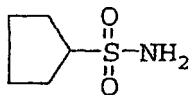
Preparación de cicloalquilsulfonamidas a partir de bromuros de cicloalquilo

Preparación de ciclobutilsulfonamida a partir de bromuro de ciclobutilo



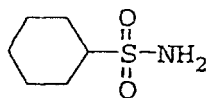
A una solución de 5,0 g (37,0 mmol) de bromuro de ciclobutilo en 30 ml de éter dietílico anhidro (Et_2O) enfriada a -78°C se le añadieron 44 ml (74,8 mmol) de *terc*-butil litio 1,7 M en pentanos y la solución se calentó lentamente a -35°C durante 1,5 h. Esta mezcla se canuló lentamente en una solución de 5,0 g (37,0 mmol) de cloruro de sulfuro recién destilado en 100 ml de hexanos, se enfrió a -40°C , se calentó a 0°C durante 1 h y se concentró cuidadosamente al vacío. Esta mezcla se disolvió de nuevo en Et_2O , se lavó una vez con una pequeña cantidad de agua enfriada con hielo, se secó (MgSO_4) y se concentró cuidadosamente. Esta mezcla se disolvió de nuevo en 20 ml de THF, se añadió gota a gota a 500 ml de NH_3 saturado en THF y se dejó en agitación durante una noche. La mezcla se concentró al vacío para dar un sólido de color amarillo en bruto y se recristalizó en la cantidad mínima de CH_2Cl_2 en hexanos con 1-2 gotas de MeOH para producir 1,90 g (38%) de ciclobutilsulfonamida en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,95-2,06 (m, 2H), 2,30-2,54 (m, 4H), 3,86 (p, $J = 8$ Hz, 1H), 4,75 (s a, 2H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 16,43, 23,93, 56,29, EMAR m/z (M-H) $^-$ calc. para $\text{C}_4\text{H}_8\text{NSO}_2$: 134,0276, encontrado 134,0282.

Preparación de ciclopentil sulfonamida



Una solución de 18,5 ml (37,0 mmol) de cloruro de ciclopentil-magnesio 2 M en éter se añadió gota a gota a una solución de 3,0 ml (37,0 mmol) de cloruro de sulfuro recién destilado (obtenido en Aldrich) en 100 ml de hexanos y se enfrió a -78°C . La mezcla se calentó a 0°C durante 1 h y después se concentró cuidadosamente al vacío. Esta mezcla se disolvió de nuevo en Et_2O (200 ml), se lavó una vez con un poco de agua enfriada con hielo (200 ml), se secó (MgSO_4) y se concentró cuidadosamente. Esta mezcla se disolvió de nuevo en 35 ml de THF, se añadió gota a gota a 500 ml de NH_3 saturado en THF y se dejó en agitación durante una noche. La mezcla se concentró al vacío para dar un sólido amarillo en bruto, el residuo se filtró a través de 50 g de gel de sílice usando EtOAc al 70%-hexanos como eluyente y después la solución se concentró. El residuo se recristalizó en la cantidad mínima de CH_2Cl_2 en hexanos con 1-2 gotas de MeOH para producir 2,49 g (41%) de ciclopentilsulfonamida en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,58-1,72 (m, 2H), 1,74-1,88 (m, 2H), 1,94-2,14 (m, 4H), 3,48-3,59 (m, 1H), 4,80 (s a, 2H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 25,90, 28,33, 63,54; EM m/e 148 (M-H) $^-$.

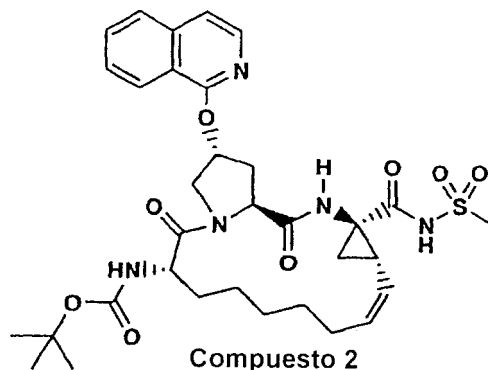
Preparación de ciclohexil sulfonamida



Una solución de 18,5 ml (37,0 mmol) de cloruro de ciclohexilmagnesio 2 M (TCI Americas) en éter se añadió gota a gota a una solución de 3,0 ml (37,0 mmol) de cloruro de sulfurilo recién destilado en 100 ml de hexanos enfriados a -78°C. La mezcla se calentó a 0°C durante 1 h y después se concentró cuidadosamente al vacío. Esta mezcla se disolvió de nuevo en Et₂O (200 ml), se lavó una vez con un poco de agua enfriada con hielo (200 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró cuidadosamente. Esta mezcla se disolvió de nuevo en 35 ml de THF, se añadió gota a gota a 500 ml de NH₃ saturado en THF y se dejó en agitación durante una noche. La mezcla se concentró al vacío para dar un sólido de color amarillo en bruto, el residuo se filtró a través de 50 g de gel de sílice usando EtOAc al 70%-hexanos como eluyente y se concentró. El residuo se recrystalizó en la cantidad mínima de CH₂Cl₂ en hexanos con 1-2 gotas de MeOH para producir 1,66 g (30%) de ciclohexil-sulfonamida en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,11-1,37 (m, 3H), 1,43-1,56 (m, 2H), 1,67-1,76 (m, 1H), 1,86-1,96 (m, 2H), 2,18-2,28 (m, 2H), 2,91 (tt, *J* = 12, 3,5 Hz, 1H), 4,70 (s a, 2H); ¹³C H RMN (CDCl₃) δ 25,04, 25,04, 26,56, 62,74; EM *m/e* 162 (M-1)⁻.

Ejemplo 5

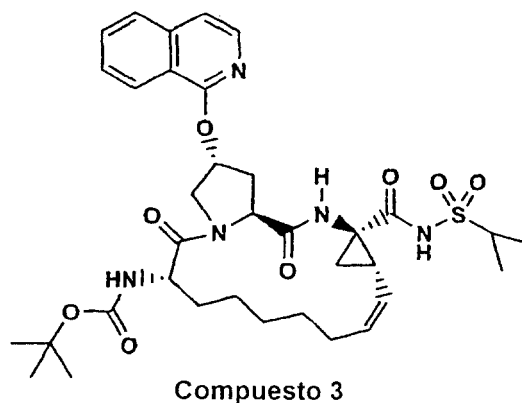
Preparación del Compuesto 2, éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-4-metanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (50 mg, 0,075 mmol) y metanosulfonamida (9,3 mg, 0,098 mmol) como se ha descrito en el procedimiento general anterior para dar éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-4-metanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃Cl₃) δ 1,18 (s, 9 H), 1,25-1,96 (m, 11 H), 2,26 (m, 1 H), 2,54 (m, 1 H), 2,71 (m, 2 H), 3,18 (s, 3 H), 4,08 (m, 1 H), 4,26 (m, 1 H), 4,64 (m, 2 H), 5,00 (m, 2 H), 5,73 (m, 1 H), 6,01 (s, 1 H), 6,73 (s, 1 H), 7,28 (d, *J* = 5,5 Hz, 1 H), 7,50 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,65-7,76 (m, 2 H), 7,98 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 8,19 (d, *J* = 7,7 Hz, 1 H), 10,28 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,57 min), EM *m/z* 670 (M⁺+1).

Ejemplo 6

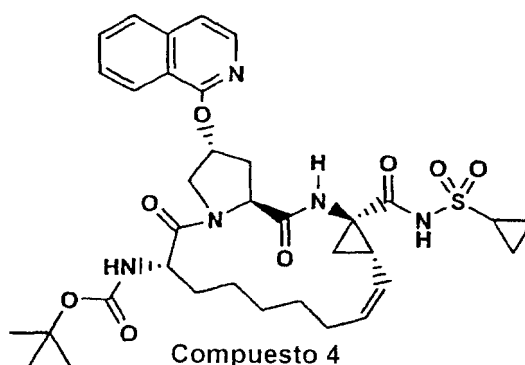
Preparación del Compuesto 3, éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(propano-2-sulfonilaminocarbonil)-3,16-diaza-triciclo-[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se disolvió ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (67 mg, 0,10 mmol) en 5 ml de THF y se trató con CDI (21 mg, 0,13 mmol). (Debe tenerse cuidado para evitar la humedad usando cristalería secada con una estufa y manteniendo una atmósfera de N₂ seca.) Después de calentar a reflujo la mezcla de reacción durante una hora, se enfrió a ta y se trató secuencialmente con isopropilsulfonamida (16 mg, 0,13 mmol) y DBU (20 mg, 0,13 mmol). Después de agitar durante 24 h a ta, el THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 1-5%/cloruro de metileno) dio 50 mg (71%) del producto deseado. La purificación adicional por HPLC preparativa (YMC ODS-A, S5, 20 x 100 mm, gradiente: B del 60% al 100%) dio 30 mg (43%) de éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(propano-2-sulfonylamino)carbonil]-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃Cl₃) δ 1,22 (s, 9 H), 1,31 (d, J = 6,6 Hz, 3 H), 1,41 (d, J = 6,9 Hz, 3 H), 1,20-1,96 (m, 11 H), 2,30 (c, J = 8,4 Hz, 1 H), 2,56 (m, 1 H), 2,69 (m, 2 H), 3,69 (m, 1 H), 4,03 (m, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 4,62 (m, 2 H), 4,97-5,06 (m, 2 H), 5,68 (c, J = 9,5 Hz, 1 H), 5,91 (s, 1 H), 6,76 (s, 1 H), 7,23 (m, 1 H), 7,45 (t, J = 7,7 Hz, 1 H), 7,63 (t, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,71 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,97 (d, J = 5,9 Hz, 1 H), 8,17 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 9,89 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,79 min), EM *m/z* 670 (M⁺+1).

Ejemplo 7

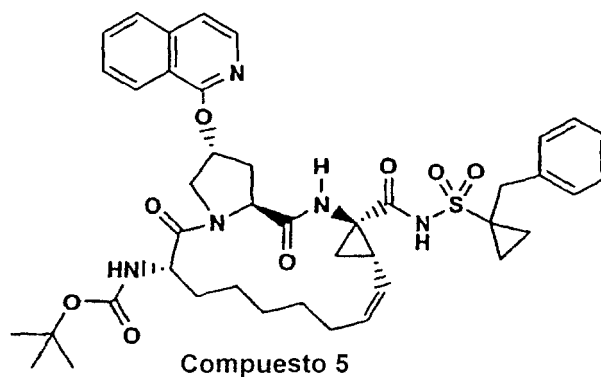
Preparación del Compuesto 4, éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonylamino]carbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ésterato del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (100 mg, 0,15 mmol) y ciclopropilsulfonamida (24 mg, 0,20 mmol) como se ha descrito en el procedimiento general anterior. La cromatografía ultrarrápida (metanol al 2%/cloruro de metileno) dio 55 mg (53%) de éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonylamino]carbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl₃) δ 0,89-0,95 (m, 1 H), 1,03-1,16 (m, 3 H), 1,22 (s, 9 H), 1,18-1,48 (m, 8 H), 1,78 (m, 1 H), 1,87 (m, 1 H), 1,94 (m, 1 H), 2,29 (c, J = 9,0 Hz, 1 H), 2,56 (m, 1 H), 2,67 (dd, J = 7,9 Hz, 2,7 Hz, 2 H), 2,90 (m, 1 H), 4,04 (dd, J = 11,3 Hz, 4,0 Hz, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 4,61 (m, 2 H), 4,97-5,03 (m, 2 H), 5,70 (m, 1 H), 5,94 (s, 1 H), 6,67 (s, 1 H), 7,25 (m, 1 H), 7,47 (t, J = 7,3 Hz, 1 H), 7,64 (t, J = 7,3 Hz, 1 H), 7,72 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,97 (d, J = 5,8 Hz, 1 H), 8,17 (d, J = 8,5 Hz, 1 H), 10,20 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,67 min), EM *m/z* 696 (M⁺+1).

Ejemplo 8

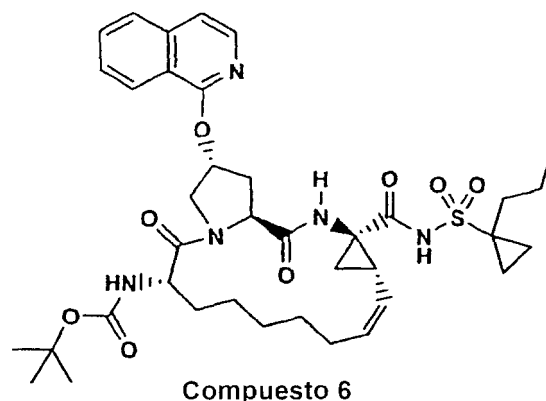
Éster terc-butílico del ácido [4-(1-bencil-ciclopropanosulfonylamino)carbonil]-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo [14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (50 mg, 0,075 mmol) y amida del ácido 1-bencil-ciclopropanosulfónico (21 mg, 0,098 mmol, preparada como se ha descrito anteriormente) para dar éster terc-butílico del ácido [4-(1-bencil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl₃) δ 1,23 (s, 9 H), 1,04-1,92 (m, 14 H), 1,96 (m, 1 H), 2,32 (dd, *J* = 17,7 Hz, 9,5 Hz, 1 H), 2,59 (m, 1 H), 2,70 (m, 2 H), 3,20 (d, *J* = 13,4 Hz, 1 H), 3,41 (d, *J* = 13,7 Hz, 1 H), 4,02 (m, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 4,61 (m, 2 H), 5,01 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 5,15 (m, 1 H), 5,78 (m, 1 H), 5,92 (s, 1 H), 6,65 (s, 1 H), 7,08 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H), 7,26 (m, 4 H), 7,46 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,64 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,72 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,97 (d, *J* = 5,8 Hz, 1 H), 8,17 (d, *J* = 8,9 Hz, 1 H), 10,05 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,87 min), EM *m/z* 786 (M⁺+1).

Ejemplo 9

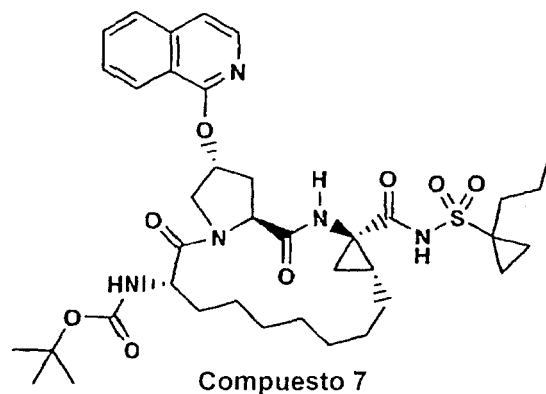
Preparación del Compuesto 6, éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(1-propil-ciclopropanosulfonilamino-carbonil)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo [14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (50 mg, 0,075 mmol) y amida del ácido 1-propil-ciclopropanosulfónico (16 mg, 0,098 mmol, preparada como se ha descrito anteriormente) para dar éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(1-propil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃Cl₃) δ 0,82-0,93 (m, 5 H), 1,23 (s, 9 H), 1,30-1,94 (m, 17 H), 2,28 (m, 1 H), 2,54 (m, 1 H), 2,68 (dd, *J* = 8,1 Hz, 3,2 Hz, 2 H), 4,05 (m, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 4,63-4,66 (m, 2 H), 4,96-5,09 (m, 2 H), 5,70 (m, 1 H), 5,92 (s, 1 H), 6,69 (s, 1 H), 7,23 (m, 1 H), 7,46 (t, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,63 (t, *J* = 8, Hz, 1 H), 7,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,97 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 8,17 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 10,12 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,77 min), EM *m/z* 738 (M⁺+1).

Ejemplo 10

Preparación del Compuesto 7, éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(1-propil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-14-il]-carbámico

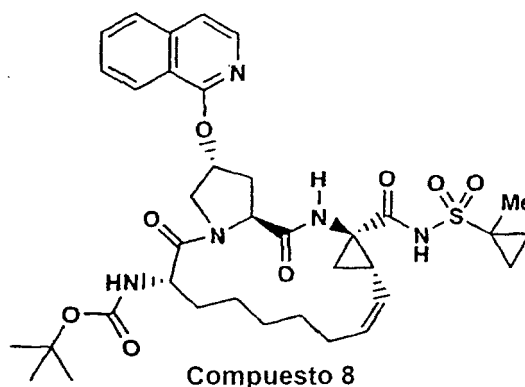


A una mezcla de 73 mg (0,1 mmol) de éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-4-(1-propilciclopropanosulfonilamino-carbonil)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en 3 ml de metanol se le añadieron 332 mg (2 mmol) de azodicarboxilato dipotásico. Se añadió lentamente ácido acético glacial (240 mg, 4 mmol) en 2 ml de metanol mediante una bomba de jeringa durante 5 h. La mezcla se agitó a ta. Después de 5 h, se añadieron 332 mg (2 mmol) de azodicarboxilato dipotásico y 240 mg (4 mmol) de ácido acético glacial

durante el transcurso de 5 h y la agitación se continuó durante una noche. Este ciclo se repitió dos veces. La CL-EM mostró que aún quedaba aproximadamente un 40% de material de partida restante. Después, el disolvente se retiró en un evaporador rotatorio. Al residuo se le añadió agua y la mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo. Después, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El aceite resultante se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC ODS-A, S5, 20 x 100 mm, gradiente: de 80% de B a 85% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para aislar el producto en forma de un polvo de color blanco (25 mg, 34%). ^1H RMN (500 MHz, CD_3Cl_3) δ 0,91 (m, 5 H), 1,30 (s, 9 H), 1,20-1,80 (m, 21 H), 1,86-1,93 (m, 2 H), 2,57 (m, 1 H), 2,67 (m, 1 H), 4,10 (m, 1 H), 4,36 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H), 4,44 (t, $J = 8,2$ Hz, 1 H), 4,61 (t, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 5,16 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H), 5,92 (s, 1 H), 6,58 (s, 1 H), 7,25 (m, 1 H), 7,49 (t, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,65 (t, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,73 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H), 7,97 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H), 8,15 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H), 10,09 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,83 min), EM m/z 740($\text{M}^+ + 1$).

Ejemplo 11

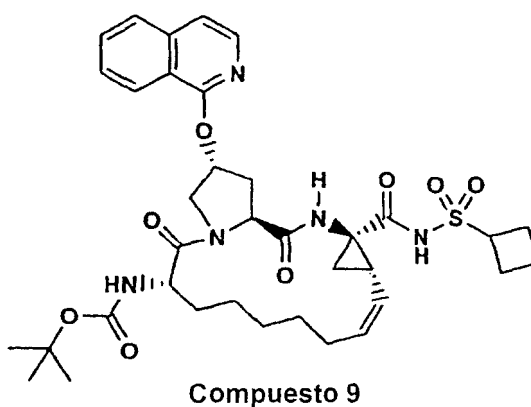
Preparación del Compuesto 8, éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-4-(1-metil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ésterato del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (105 mg, 0,177 mmol) y amida del ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico (31 mg, 0,23 mmol, preparada como se ha descrito anteriormente). La cromatografía ultrarrápida (metanol al 2%/cloruro de metileno) dio 73 mg (58%) de éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-4-(1-metil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,50 min), EM m/z 710 ($\text{M}^+ + 1$).

Ejemplo 12

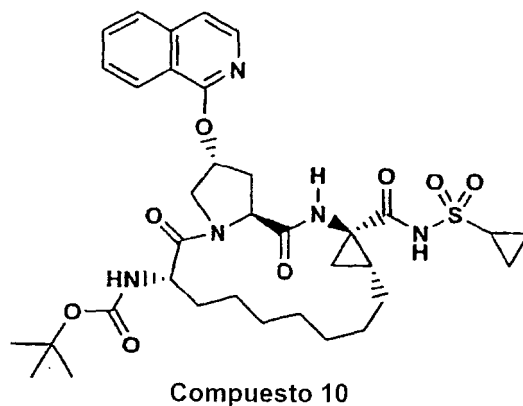
Preparación de Compuesto 9, éster terc-butílico del ácido [4-ciclobutanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de ésterato del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (114 mg, 0,192 mmol) y amida del ácido ciclobutanosulfónico (34 mg, 0,25 mmol) como se ha descrito en el procedimiento general anterior. La cromatografía ultrarrápida (metanol al 2%/cloruro de metileno) dio 73 mg (58%) de éster terc-butílico del ácido [18-(isoquinolin-1-iloxi)-4-(1-metil-ciclopropanosulfonilaminocarbonil)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un polvo de color blanco: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,55 min), EM m/z 710 ($\text{M}^+ + 1$).

Ejemplo 13

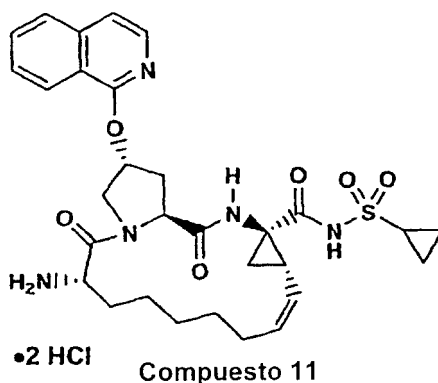
Preparación del Compuesto 10, éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-di-oxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-14-il]-carbámico



A una mezcla de 140 mg (0,2 mmol) de éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en 3 ml de metanol se le añadieron 656 mg (4 mmol) de azodicarboxilato dipotásico. Se añadió lentamente ácido acético glacial (480 mg, 8 mmol) en 2 ml de metanol mediante una bomba de jeringa durante 5 h. La mezcla se agitó a ta. Después de 5 h, se añadieron 656 mg más (4 mmol) de azodicarboxilato dipotásico y 480 mg (8 mmol) de ácido acético glacial durante el transcurso de 5 h y la agitación se continuó durante una noche. Este ciclo se repitió dos veces. La CL-EM mostró que aún quedaba aproximadamente un 40% de material de partida restante. Después, el disolvente se retiró en un evaporador rotatorio. Al residuo se le añadió agua y la mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo. Después, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El aceite resultante se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC TERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 72% de B a 78% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 40 ml/min) para aislar el producto en forma de un polvo de color blanco (80 mg, 57%). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,59 min), EM m/z 698 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 14

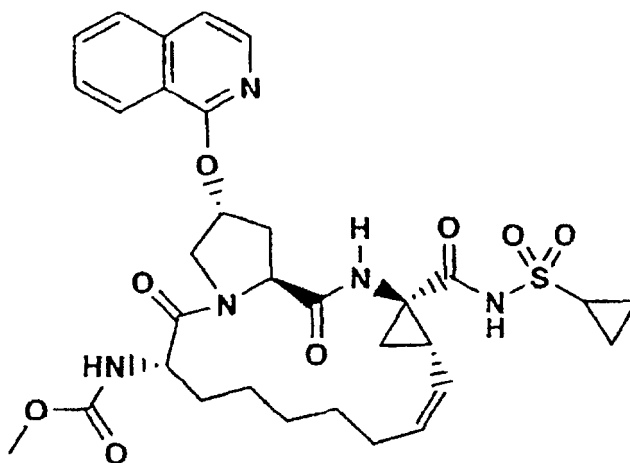
Preparación del Compuesto 11, bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico



Una suspensión agitada de éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropano-sulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico (1,20 g, 1,7 mmol) se trató con HCl 4 N/dioxano (Aldrich) (10 ml) durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío para dar 1,10 g (92%) de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico en forma de un sólido de color blanco: CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,39 min), EM m/z 596 ($M^+ + 1 - 2 \text{ HCl}$).

Ejemplo 15

Preparación del compuesto 12, éster metílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

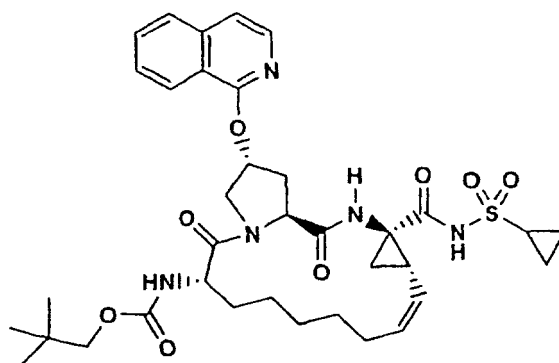


Compuesto 12

A una mezcla de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico (50 mg, 0,075 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron 44 ml (0,25 mmol) de DIPEA y 9 mg (0,10 mmol) de cloroformiato de metilo. La mezcla se agitó a ta durante 2 h. Después, se diluyó con EtOAc y se lavó con tampón a pH 4 (2 x) y salmuera (1 x). La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2%/DCM) dio 40 mg (82%) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco: CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,05 min), EM m/z 654 ($\text{M}^+ + 1$).

Ejemplo 16

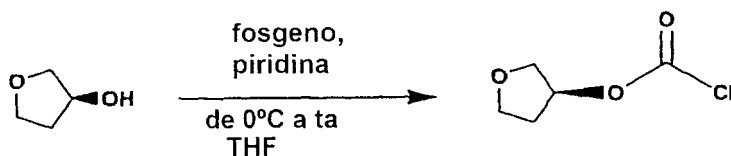
Preparación del Compuesto 13, del 2,2-dimetil-propil éster ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-di-oxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Compuesto 13

A una mezcla de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico (50 mg, 0,075 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron 44 ml (0,25 mmol) de DIPEA y 15 mg (0,1 mmol) de cloroformiato de neopentilo. La mezcla se agitó a ta durante 2 h. Después, se diluyó con EtOAc y se lavó con tampón a pH 4 (2 x) y salmuera (1x). La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. El aceite resultante se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC XTERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 65% de B a 100% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 40 ml/min) para aislar el producto en forma de un polvo de color blanco (42 mg, 79%): CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,58 min), EM m/z 710 ($\text{M}^+ + 1$).

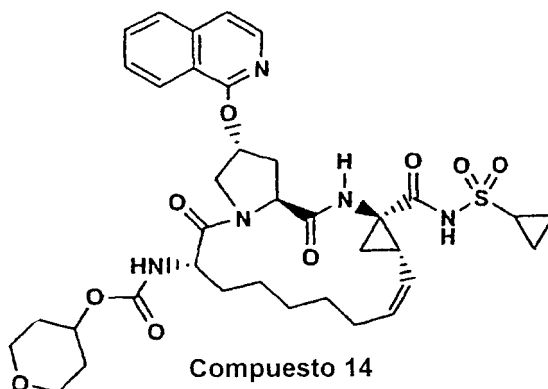
Procedimiento General para la Preparación de cloroformatos



Este procedimiento se usó para la preparación de cloroformatos no disponibles en el mercado. A una solución de 5,96 g (67,6 mmol) de los reactivos disponibles en el mercado (S)-3-hidroxitetrahydrofuran y piridina (5,8 ml; 72 mmol) en THF (150 ml) enfriada a 0°C se le añadió una solución 1,93 M de fosgeno en tolueno (48 ml, 92,6 mmol) durante 10 min en atmósfera de argón. La solución resultante se dejó calentar a ta durante 2 h, el sólido resultante se filtró y las aguas madre se concentraron cuidadosamente al vacío a temperatura ambiente hasta que se obtuvo la masa teórica. El residuo resultante se disolvió en 100 ml de THF para preparar una solución madre 0,68 M de cloroformato de 3 (S)-oxo-tetrahydrofuran que puede almacenarse en el congelador hasta el uso. De una manera análoga, otros alcoholes disponibles en el mercado pueden convertirse en soluciones madre 0,68 M de los cloroformatos correspondientes.

Ejemplo 17

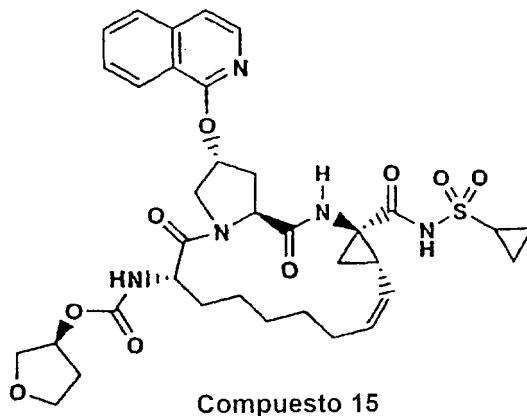
Preparación del Compuesto 14, tetrahidro-piran-4-il éster del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-di-oxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico (50 mg, 0,075 mmol), 44 µl (0,25 mmol) de DIPEA y 0,17 ml (0,1 mmol) de cloroformato de tetrahidropirano (preparado por tratamiento de tetrahidro-piran-4-ol con fosgeno) en DCM como se ha descrito en el procedimiento anterior para dar 28 mg (52%) de un sólido de color blanco. Condición de HPLC preparativa: YMC XTERRA, S5, 19 x 100 mm, gradiente: de 50% de B a 100% de B, 10 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min. CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,13 min), EM m/z 724 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 18

Preparación del Compuesto 15, tetrahidro-furan-3-il éster del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-di-oxo-3,16-diaza-triciclo[4,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

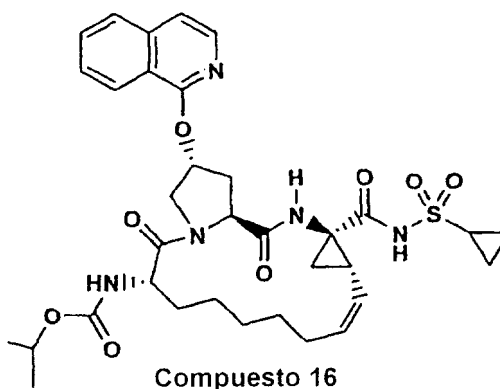


ES 2 320 771 T3

Se preparó a partir de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico (50 mg, 0,075 mmol), 44 μ l (0,25 mmol) de DIPEA y 0,10 ml (0,1 mmol) de cloroformiato de tetrahidro-furan-3-ilo (preparado por tratamiento de tetrahidrofurano-3-ol con fosgeno) en DCM como se ha descrito en el procedimiento anterior para dar 28 mg (52%) de un sólido de color blanco. Condición de HPLC preparativa: YMC ODS-A, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 50% de B a 85% de B, 8 min, mantenido 2 min, caudal 45 ml/min. CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,05 min), EM m/z 710 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 19

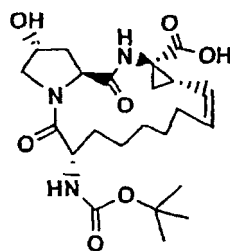
Preparación del Compuesto 16, isopropil éster del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-di-oxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se preparó a partir de bis clorhidrato de [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico (50 mg, 0,075 mmol), 44 μ l (0,25 mmol) de DIPEA y 0,10 ml (0,1 mmol) de cloroformiato de isopropilo 1 M en tolueno (Aldrich) como se ha descrito en el procedimiento anterior para dar 40 mg (78%) de un sólido de color blanco. Condición de HPLC preparativa: YMC XTERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 50% de B a 100% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 40 ml/min) RMN (300 MHz, CD₃OD) δ . CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,32 min), EM m/z 682 ($M^+ + 1$).

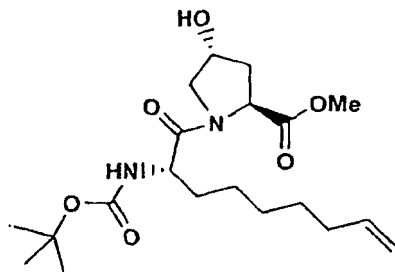
Ejemplo 20

Preparación de ácido (1S,4R,6S,14S,18R)-7-cis-14-terc-butoxycarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-di-azatri-ciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico para uso en la preparación del Compuesto 17 del Ejemplo 21



Etapa 20A

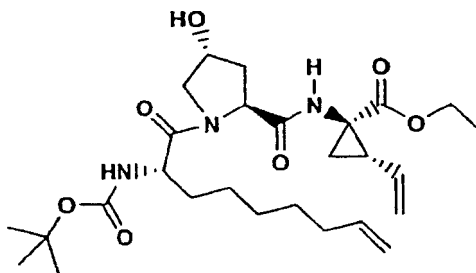
Preparación de éster metílico del ácido 1-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carboxílico



Una solución de ácido 2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-8-nonenoico (adquirido en RSP Amino Acids) (3,5 g, 12,9 mmol) en 200 ml de DCM se trató secuencialmente con clorhidrato de éster metílico del ácido 4(*R*)-hidroxipirrolidina-2(*S*)-carboxílico (2,15 g, 11,8 mmol), *N*-metil morfolina (4,25 ml, 38,6 mmol) y HATU (5,37 g, 14,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 3 días y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4 (bifalato). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (de acetato de etilo al 50%/hexano a acetato de etilo al 100%) dio 4,7 g (~100%) de éster metílico del ácido 1-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carboxílico en forma de un aceite incoloro: ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 1,33-1,50 (m, 8 H), 1,46 (s, 9 H), 1,57 (m, 1 H), 1,72 (m, 1 H), 2,08 (m, 2 H), 2,28 (m, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 3,75-3,87 (m, 2 H), 4,36 (m, 1 H), 4,51 (s a, 1 H), 4,57 (t, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 4,95 (d, *J* = 10,4 Hz, 1 H), 5,01 (m, 1 H), 5,83 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,01 min), EM *m/z* 399 (M⁺+1).

Etapa 20B

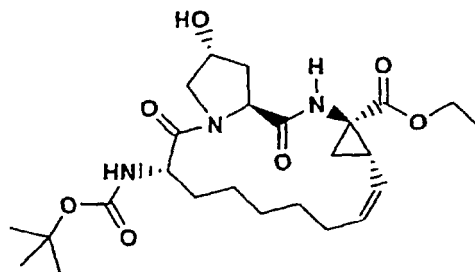
Preparación de éster etílico del ácido 1-[-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carbonil]--(1*R*)-amino-2(*S*)-vinil-ciclopropanocarboxílico



Se disolvió éster metílico del ácido 1-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carboxílico (4,7 g, 11,8 mmol) en THF (80 ml), metanol (20 ml) y agua (40 ml). Se añadió hidróxido de litio en polvo (5,6 g, 233 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 16 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta que el pH fue de 4. Esta solución ácida se extrajo con EtOAc (3 x). Los extractos de EtOAc combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 4,36 g (96%) de ácido 1-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-8-nonenoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carboxílico en forma de un sólido de color blanco. Después, este ácido se disolvió en 150 ml de DMF y se añadieron clorhidrato de éster etílico del ácido (1*R*,2*S*)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico (2,61 g, 13,6 mmol), *N*-metil morfolina (2,5 ml, 22,6 mmol) y HATU (5,2 g, 13,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 16 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4 (bifalato). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al 60%-80%/hexano) dio 6,0 g (98%) de éster etílico del ácido 1-[-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carbonil]--(1*R*)-amino-2(*S*)-vinil-ciclopropanocarboxílico en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 1,25 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,33-1,80 (m, 10 H), 1,46 (s, 9 H), 2,09 (m, 3 H), 2,25 (m, 2 H), 3,76 (m, 2 H), 4,14 (m, 2 H), 4,27 (dd, *J* = 8,5, 5,2 Hz, 1 H), 4,50 (m, 2 H), 4,94 (d, *J* = 10,1 Hz, 1 H), 5,01 (dd, *J* = 17,1, 1,8 Hz, 1 H), 5,11 (dd, *J* = 10,4, 1,8 Hz, 1 H), 5,30 (d, *J* = 15,6 Hz, 1 H), 5,80 (m, 2 H), 8,57 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,21 min), EM *m/z* 522 (M⁺+1).

Etapa 20C

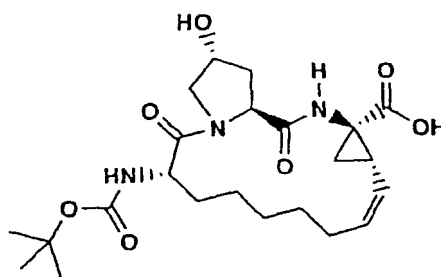
Preparación de éster etílico del ácido (1*S*,4*R*,6*S*,14*S*,18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



Una solución de éster etílico del ácido 1-{[1-(2(*S*)-*terc*-butoxicarbonil-amino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)carbonil]-(1*R*)-amino}-2(*S*)-vinilciclopropano-carboxílico (800 mg, 1,53 mmol) en 2 l de cloruro de metileno se lavó abundantemente con N₂ durante 0,5 h. Después, se añadió dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-trimetil-fenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno][bencilideno]-rutenio (IV) (Strem) (64 mg, 0,075 mmol) y la mezcla se lavó abundantemente con N₂ durante 10 min más. La solución homogénea de color naranja claro se calentó a reflujo durante 2 h para dar una solución de color naranja oscuro. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se concentró al vacío para dar un aceite de color naranja. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo) dio 460 mg (61%) de éster etílico del ácido (1*S*,4*R*,6*S*,14*S*,18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color gris. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 1,19 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,42 (s, 9 H), 1,22-1,8 (m, 8 H), 1,87 (m, 2 H), 2,03-2,22 (m, 4 H), 2,63 (m, 1 H), 3,65 (m, 1 H), 4,09 (m, 3 H), 4,45 (m, 1 H), 4,56 (s, 1 H), 4,82 (m, 1 H), 5,23 (m, 1 H), 5,51 (s, 1 H), 7,16 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 2,97 min), EM *m/z* 494 (M⁺+1).

Etapa 20D

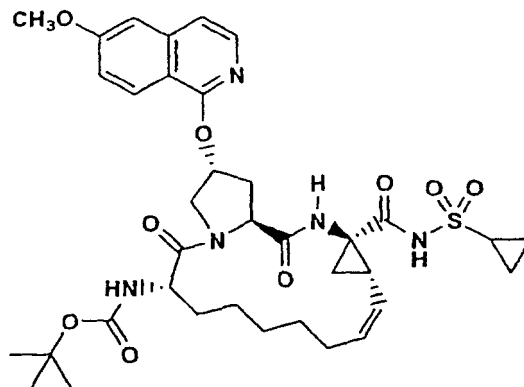
Ácido (1*S*,4*R*,6*S*,14*S*,18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



A una solución de éster etílico del ácido (1*S*,4*R*,6*S*,14*S*,18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diazatri-ciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (493 mg, 1,0 mmol) en THF (4 ml), metanol (1 ml) y agua (2 ml) se le añadió hidróxido de litio en polvo (480 mg, 20 mmol) y la suspensión de color amarillo claro se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 16 h. Después, la mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta pH 4. Esta solución ácida se extrajo tres veces con EtOAc. Los extractos de EtOAc combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 460 mg (98%) del Ejemplo 26, ácido (1*S*,4*R*,6*S*,14*S*,18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color gris. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 1,26 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,35-1,52 (m, 15 H), 1,57-1,68 (m, 3 H), 1,79 (m, 1 H), 2,04 (m, 1 H), 2,16-2,41 (m, 3 H), 3,80 (dd, *J* = 10,7, 4,3 Hz, 1 H), 3,88 (m, 1 H), 4,38 (dd, *J* = 8,9, 3,1 Hz, 1 H), 4,55 (m, 2 H), 5,39 (t, *J* = 9,8 Hz, 1 H), 5,58 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 2,64 min), EM *m/z* 466 (M⁺+1).

Ejemplo 21

Preparación del Compuesto 17B, éster *tert*-bútilico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

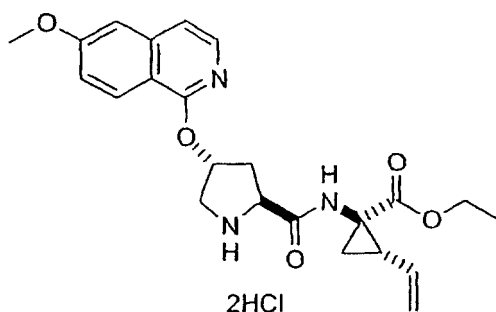


Compuesto 17B

A una mezcla de ácido 4-*tert*-butoxicarbonilamino-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (215 mg, 0,46 mmol) en DMSO (5 ml) se le añadieron *t*-BuOK (125 mg, 1,11 mmol) y 1-cloro-6-metoxi-isoquinolina (110 mg, 0,56 mmol). La reacción se agitó durante 16 h a ta. Después, la mezcla de reacción se repartió entre éter (10 ml) y agua (10 ml). La fase acuosa se acidificó a pH 4 usando HCl 1 N. La solución resultante se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Los extractos de EtOAc combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para dar un sólido de color blanco. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2%/CH₂Cl₂) dio 140 mg (49%) del derivado de ácido carboxílico en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,80 min), EM *m/z* 543 (M⁺+1). El sólido anterior (140 mg, 0,22 mmol) se trató con ciclopropilsulfonamida (35 mg, 0,28 mmol) como se ha descrito en el procedimiento general anterior para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2%/DCM) dio 90 mg del producto deseado. La purificación adicional por HPLC preparativa (YMC Xterra, S5, 30 x 50 mm, del 50% al 100% de B, gradiente 9 min, mantenido 1 min, caudal 40 ml/min) dio 30 mg (19%) del producto en forma de un polvo de color blanco: CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,86 min), EM *m/z* 726 (M⁺+1).

Ejemplo 22

Preparación de éster etílico del ácido 1-{{4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil}-amino}-2-vinil-ciclopropanocarboxílico (en forma de la sal bis HCl) para uso en el Ejemplo 24

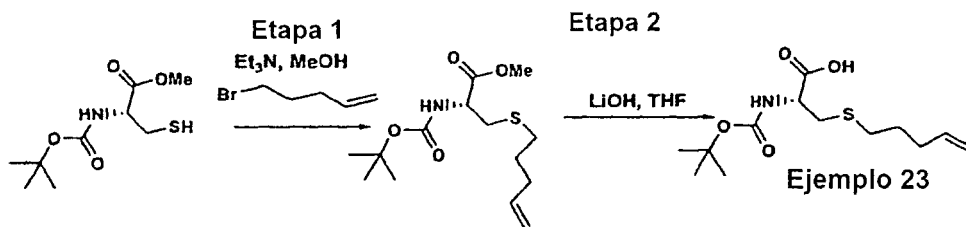


Ejemplo 22

Se preparó utilizando la misma secuencia sintética empleada para la preparación del producto de la Etapa 2B del Ejemplo 3 con la excepción de que se usó 6-Metoxi-1-cloroquinolina (descrita en el Ejemplo 1, p. ej. Etapa 1a y Etapa 1b) en lugar de 1-cloroquinolina.

Ejemplo 23

Preparación de Ejemplo 23, ácido 2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-3-pent-4-enilsulfanilpropiónico para uso en el Ejemplo 24



Etapa 1

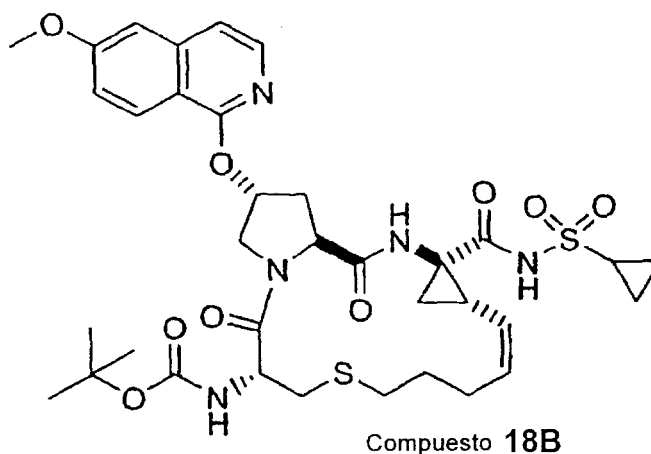
A una solución de éster metílico de *N*-Boc-cisteína (3,36 g, 0,014 mol) en metanol (166 ml) a TA se le añadieron trietilamina (10,8 ml) y 1-bromopent-4-eno (3,19 g, 21 mmol, 1,5 equivalentes) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla se concentró al vacío y la mezcla residual resultante se purificó usando cromatografía ultrarrápida (gradiente de hexano, acetato de etilo) para proporcionar 1,76 g (41%) del tioéter deseado. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ1,43 (s, 9H), 1,64 (m, 2H), 2,11 (m, 2H), 2,51 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 4,51 (m, 1H), 4,95-5,03 (m, 2H), 5,34 (m, 1H), 5,80 (1H, m). CL-EM (Procedimiento B, con la excepción de que el tiempo de gradiente fue de 3 min, y el caudal fue de 4 ml/min, tiempo de retención: 2,29 min), EM *m/z* 304 (M⁺+1).

Etapa 2

El producto de tioéter de la etapa 1 (9,51 g, 31,4 mmol) se añadió a una mezcla de LiOH 1 M en agua (200 ml) y THF (200 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se acidificó usando ácido clorhídrico 1 N y la mezcla resultante se extrajo varias veces con acetato de etilo. Los extractos se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para proporcionar el ácido deseado que se usó tal cual en la siguiente reacción.

Ejemplo 24

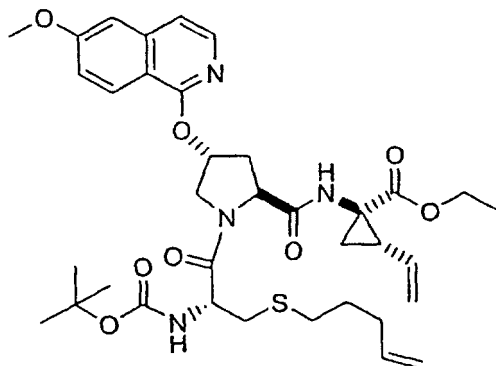
Preparación del Compuesto 18B, éster *tert*-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-12-tia-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Compuesto 18B

Etapa 24A

Preparación de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-pent-4-enilsulfanil-propionil)-4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinil-ciclopropanocarboxílico

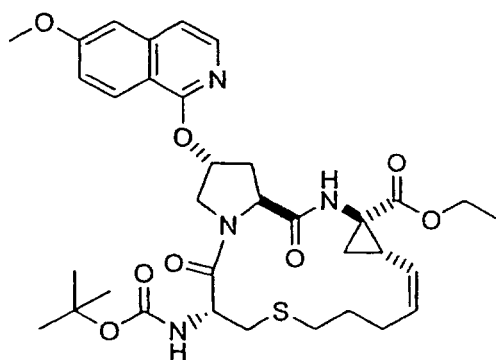


A una solución del ácido carboxílico del Ejemplo 23 (289 mg, 1,00 mmol, 1 equiv.) en DMF (9 ml) se le añadieron secuencialmente el producto de dipéptido del Ejemplo 22 (498 mg, 1,00 mmol, 1 equiv.), HATU (456 mg, 1,20 mmol, 1,2 equiv.) y N-metil morfolina (385 μ l, 3,50 mmol, 3,5 equiv.). La solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche, momento en el que la CL/EM indicó la formación del producto y la desaparición del material de partida 2. Se añadió una solución de tampón a pH 4 y la mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío. Se realizó cromatografía (gel de sílice, gradiente de Acetato de etilo/Hexano) para obtener el tripéptido puro 3 con rendimiento cuantitativo.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,03 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 7,56 (s a, 1H), 7,15-7,09 (m, 2H), 7,01 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 5,86-5,68 (m, 3H), 5,39-5,22 (m, 2H), 5,12-4,82 (m, 4H), 4,61 (c ap., $J = 6,8$ Hz, 1H), 4,24-4,04 (m, 3H), 3,91 (s, 3H), 3,02-2,90 (m, 1H), 2,84-2,69 (m, 2H), 2,66 (m, 3H), 2,24-2,08 (m, 2H), 1,88 (dd, $J = 5,5, 8,0$ Hz, 1H), 1,68 (quint. ap., $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,56 (dd, $J = 5,4, 9,5$ Hz, 1H), 1,42 (m, 1H), 1,31 (s, 9H), 1,27-1,20 (m, 4H). [m/z] + H 697, TERRA 3,0 X 50 mm S7 tiempo de retención = 1,937 min, HPLC procedimiento 2 min, gradiente de 0% de B a 100% de B, después 1 min a 100% de B (tiempo de realización total 3 min).

Etapa 24B

Preparación de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-12-tia-3,16-di-aza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



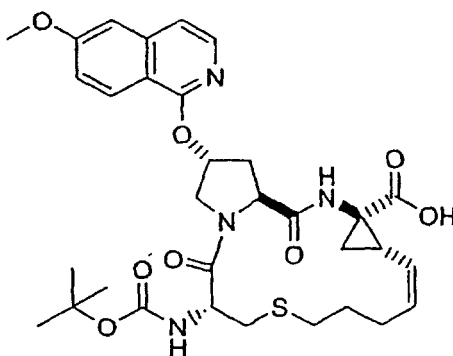
A una solución del producto de tripéptido de la Etapa 24A (384,6 mg, 553 μ mol, 1 equiv.) en dicloroetano (159 ml) se le añadió dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno[bencilidino]rutenio (IV) (48,5 mg, 57 μ mol, 0,10 equiv.) y se calentó a reflujo durante 16 h. La reacción se concentró al vacío. Se realizó cromatografía (gel de sílice, gradiente de Acetato de etilo/Hexano) para obtener el macrociclo puro, con un rendimiento del 73%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,04 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,59 (s a, 1H), 7,16-7,09 (m, 2H), 7,00 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,78-5,71 (m, 1H), 5,64 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,58-5,50 (m, 1H), 5,36 (m, 1H), 5,03 (dd, $J = 4,2, 8,3$ Hz, 1H), 4,81-4,75 (m, 1H), 4,27-4,14 (m, 2H), 3,98-3,93 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,13-3,02 (m, 2H), 3,00-2,94 (m, 1H), 2,69 (dt, $J = 3,9, 11,2$ Hz, 1H), 2,52-2,42 (m, 2H), 2,36-2,26 (m, 2H), 2,16-2,08 (m, 1H), 1,96 (dd, $J = 5,5, 8,2$ Hz, 1H), 1,86-1,76 (m, 1H), 1,68-1,58 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,29 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 1,27-1,21 (m, 1H).

[m/z] + H 669.

XTERRA 3,0 X 50 mm S7 tiempo de retención = 1,797, HPLC procedimiento 2 min gradiente de 0% de B a 100% de B, después 1 min a 100% de B (tiempo de realización total de 3 min).

Etapa 24C

Preparación de ácido 18A, 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-12-tia-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



Compuesto 18A

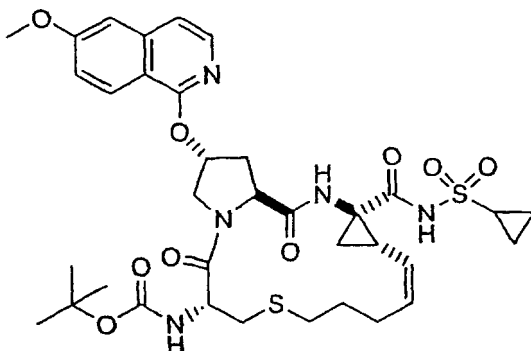
A una solución del producto de éster de macrociclo de la Etapa 24B (271 mg, 406 μ mol, 1 equiv.) en THF (4,1 ml) se le añadieron LiOH (97 mg, 4,04 mmol, 10 equiv.), agua (0,45 ml) y MeOH (1,9 ml). La reacción se dejó en agitación durante 16 h, momento en el que la CL/EM indicó que la hidrólisis se había completado. Se añadió una solución 1 M de HCl en agua y la mezcla resultante se extrajo 3 veces en acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para proporcionar el ácido carboxílico puro con rendimiento cuantitativo.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,50 (s a, 1H), 8,59 (s a, 1H), 8,22 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,14-8,07 (m, 1H), 7,46 (s a, 2H), 7,33-7,25 (m, 2H), 5,95 (s a, 1H), 5,79-5,56 (m, 2H), 4,66-4,57 (m, 1H), 4,50-4,37 (m, 2H), 4,24-4,11 (m, 2H), 4,05 (s, 3H), 3,60-3,40 (m, 2H), 3,09-2,97 (m, 1H), 2,91-2,81 (m, 1H), 2,65-2,58 (m, 1H), 2,56-2,44 (m, 2H), 2,44-2,33 (m, 1H), 1,84-1,73 (m, 1H), 1,72-1,57 (m, 2H), 1,34 (s, 9H), 1,08-0,95 (m, 1H).

[m/z] + H 641 TERRA 3,0 X 50 mm S7 tiempo de retención = 1,673, HPLC procedimiento 2 min gradiente de 0% de B a 100% de B, después 1 min a 100% de B (tiempo de realización total de 3 min).

Etapa 24D

Preparación del Compuesto 18B, éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-3,15-dioxo-12-tia-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Compuesto 18B

A una solución del producto de ácido carboxílico de la Etapa 24 C (236,3 mg, 369 μ mol, 1 equiv.) en THF (5,2 ml) se le añadió carbonil diimidazol (143 mg, 738 μ mol, 2 equiv.) y se calentó a reflujo durante 2,5 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente, momento en el que se añadieron ciclopropil sulfonamida (158 mg, 1,1 mmol, 3 equiv.) y DBU (127 μ l, 849 μ mol, 2,3 equiv.). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió una solución 1 M de HCl en agua y el producto se extrajo tres veces en cloruro de metileno. Las fases orgánicas se lavaron

ES 2 320 771 T3

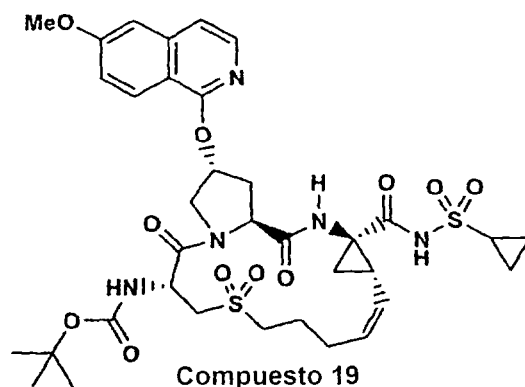
con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío. Se realizó cromatografía (Gel de sílice, gradiente de Acetato de etilo/Hexano) para obtener el Compuesto de sulfonamida puro 18, con un rendimiento del 78%.

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,10 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 7,89-7,83 (m, 2H), 7,21 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,05 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 5,81 (s, 1H), 5,68 (c ap., J = 8,9 Hz, 1H), 5,16 (t ap., J = 9,7 Hz, 1H), 4,59-4,52 (m, 2H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,12-4,04 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 2,98-2,78 (m, 3H), 2,73-2,41 (m, 6H), 2,02-1,98 (m, 1H), 1,75 (dd, J = 5,5, 8,2 Hz, 1H), 1,71-1,53 (m, 3H), 1,32-1,20 (m, 1H), 1,16 (s, 9H), 1,14-0,95 (m, 2H). [m/z] + H 744.

TERRA 3,0 X 50 mm, S7 tiempo de retención = 1,700, HPLC procedimiento 2 min gradiente de 0% de B a 100% de B, después 1 min a 100% de B (tiempo de realización total de 3 min).

Ejemplo 25

Preparación del Compuesto 19, éster terc-butílico del ácido 4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isquinolin-1-iloxi)-2,12,12,15-tetraoxo-12-tia-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

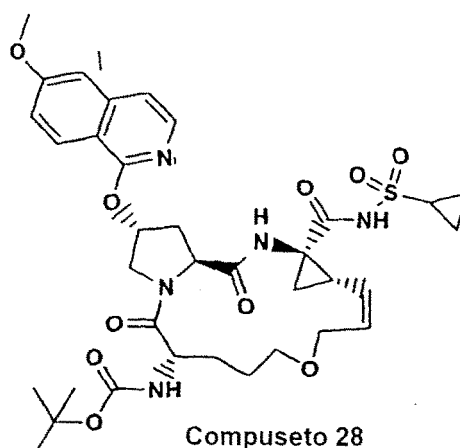
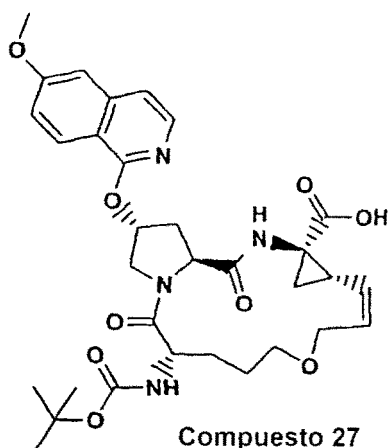


A una solución del Compuesto 18 (84,7 mg, 114 μ mol) en MeOH (1,4 ml) y agua (460 μ l) a 0°C se le añadió oxone (210,6 mg, 343 μ mol, 3,0 equiv.). La mezcla se agitó durante 20 min a 0°C y después se dejó en agitación durante 3 h a temperatura ambiente. Después, se añadieron agua y cloruro de metileno y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo dos veces más con cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío. El producto se purificó por TLC prep. (acetato de etilo) para producir la sulfona (37,2 mg, 42% de rendimiento).

¹H RMN (CD₃OD) δ 8,11 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 7,20-7,15 (m, 1H), 7,11 (dd, J = 1,8, 8,9 Hz, 1H), 5,87-5,81 (m, 1H), 5,61-5,47 (m, 2H), 4,96-4,90 (m, 1H), 4,67 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 4,46-4,39 (m, 1H), 4,27-4,20 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,84-3,72 (m, 1H), 2,94-2,84 (m, 2H), 2,67-2,58 (m, 2H), 2,47-2,37 (m, 1H), 2,37-2,25 (m, 2H), 1,85-1,73 (m, 2H), 1,72-1,64 (m, 1H), 1,49-1,38 (m, 1H), 1,20 (s, 9H), 1,16-1,02 (m, 3H), 1,00-0,82 (m, 3H).

Ejemplo 26

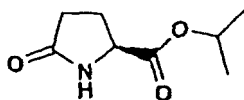
Preparación del Compuesto 27 y el Compuesto 28



ES 2 320 771 T3

Etapa 26A

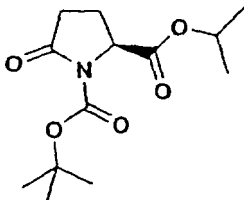
Preparación de pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo



Una solución de ácido L-pirolglutámico (Aldrich, 25,0 g, 195 mmol) y ácido paratoluenosulfónico monohidrato (3,71 g, 19,5 mmol) se calentó a reflujo en isopropanol (40 ml) en atmósfera de nitrógeno durante 6 horas usando una variación del purgador Dean-Stark (condensado devuelto a través de un extractor Soxhlet cargado con tamices moleculares de 4 Å). Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con éter, se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado y después NaCl acuoso saturado, se secó (MgSO_4) y se evaporó para dar un jarabe incoloro. Cristalizó después de un periodo de reposo. La trituración del residuo cristalino en hexano proporcionó 31,9 g (96%) de pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo en forma de prismas de color blanco: ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-D) δ 6,35 (s a, 1 H), 5,04 (sept., 1 H, $J = 6,2$ Hz), 4,18 (dd, 1 H, $J = 8,4, 5,3$ Hz), 2,51-2,28 (m, 3 H), 2,27-2,12 (m, 1 H), 1,24 (d, 6 H, $J = 6,2$ Hz). CLEM m/z 172 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Etapa 26B

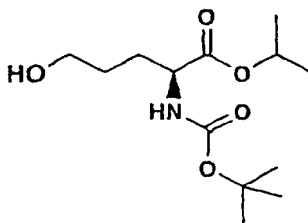
Preparación de 1-(terc-butoxicarbonil)-pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo



Una solución de pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo (producto de la etapa 26A, 31,9 g, 188 mmol), dicarbonato de di-terc-butilo (48,6 g, 225 mmol) y DMAP (2,30 g, 8,8 mmol) en acetonitrilo (300 ml) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de N_2 durante 30 minutos. La reacción se evaporó a aproximadamente 100 ml, se diluyó con éter, se lavó con HCl 1 N y después NaCl acuoso saturado, se secó (MgSO_4) y se evaporó para dar 1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo en forma de un aceite de color amarillo claro, 50,1 g (99%): ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-D) δ 5,06 (sept., 1 H, $J = 6,2$ Hz), 4,53 (dd, 1 H, $J = 9,5, 2,9$ Hz), 2,66-2,40 (m, 2H), 2,36-2,22 (m, 1 H), 2,03-1,93 (m, 1 H), 1,47 (s, 9 H), 1,26 (d, 3 H, $J = 6,2$ Hz), 1,24 (d, 3 H, $J = 6,2$ Hz). CLEM m/z 272 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Etapa 26C

Preparación de 2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)-5-hidroxipentanoato de isopropilo

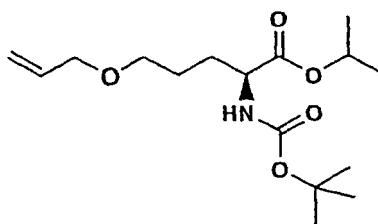


A una solución de 1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidin-5-ona-2(S)-carboxilato de isopropilo (producto de la etapa 26B, 49,5 g, 183 mmol) en metanol (300 ml) se le añadió borohidruro sódico (10,0 g, 263 mmol) en porciones de ~ 1 g durante 1,5 horas. La reacción se agitó en atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos más. Se diluyó con agua, se extrajo con éter y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron para dar un aceite de color amarillo claro. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 20-30%/hexano) dio 31,8 g (64%) de 2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)-5-hidroxipentanoato de isopropilo en forma de un jarabe incoloro: ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-D) δ 5,16 (d a, 1 H, $J = 7,3$ Hz), 5,03 (sept., 1 H, $J = 6,2$ Hz), 4,28 (d a, 1 H, $J = 6,2$ Hz), 3,67 (dd a, $J = 10,2, 5,5$ Hz), 1,94-1,79 (m, 2 H), 1,76-1,67 (m, 1 H), 1,66-1,56 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H), 1,25 (d, 3 H, $J = 6,2$ Hz), 1,23 (d, 3 H, $J = 6,2$ Hz). CLEM m/z 276 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

ES 2 320 771 T3

Etapla 26D

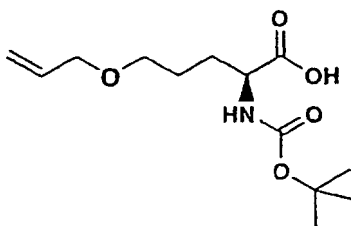
Preparación de 5-aliloxi-2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)pentanoato de isopropilo



Una mezcla desgasificada de 2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)-5-hidroxipentanoato de isopropilo (producto de la etapa 26C, 17,6 g, 63,9 mmol), carbonato de alil metilo (24,0 ml, 213 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1,62 g, 1,78 mmol) y BINAP (4,42 g, 7,10 mmol) en THF (150 ml) se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con éter, se filtró a través de celite y se evaporó, dando un jarabe de color pardo oscuro. La cromatografía ultrarrápida del residuo (gel de sílice, éter al 30%/hexano) dio 5-aliloxi-2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)pentanoato de isopropilo en forma de un aceite incoloro viscoso, 16,3 g (81%): ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-D) δ 5,88 (ddt, 1 H, 17,4, 10,4, 5,5), 5,28 (m, 1 H), 5,22-5,11 (m, 1 H), 5,02 (sept., 1 H, $J = 6,2$ Hz), 4,21 (t a, 1 H, $J = 6,7$ Hz), 3,94 (dt, 2 H, $J = 5,9, 1,5$ Hz), 3,42 (t, 2 H, $J = 5,9$ Hz), 1,90-1,82(m,1H), 1,75-1,57 (m,3H),1,42 (s,9H),1,21(d,3H, $J = 6,2$ Hz), 1,19(d, 3H, $J = 6,2$ Hz).CLEM m/z 316(M+H) $^+$.

Etapla 26E

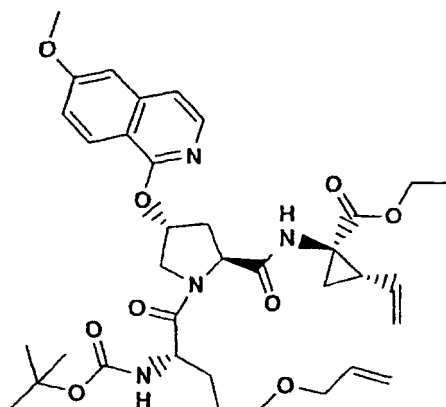
Preparación de ácido 5-aliloxi-2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)pentanoico



Una mezcla de 5-aliloxi-2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)pentanoato de isopropilo (producto de la etapa 26D, 16,1 g, 51,1 mmol) e hidróxido de litio hidrato (4,19 g, 102 mmol) en THF/agua (100 ml/20 ml) se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. La reacción se diluyó con agua, se lavó con éter, el pH de la fracción acuosa se ajustó a ~4, se extrajo con éter y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, dando ácido 5-aliloxi-2(S)-(terc-butoxicarbonilamino)pentanoico en forma de un jarabe de color amarillo claro: ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-D) δ 5,89 (ddt, 1 H, $J = 17,4, 10,4, 5,5$), 5,25 (dd, 1 H, $J = 17,4, 1,6$ Hz), 5,17 (dd, 1 H, $J = 10,4, 1,6$ Hz), 4,30 (d a, 1 H, $J = 6,2$), 3,96 (dt, 2 H, $J = 5,9, 1,5$ Hz), 3,46 (t, 2 H, $J = 5,9$ Hz), 1,96-1,86 (m, 1 H), 1,85-1,77 (m, 1 H), 1,75-1,64 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H). CLEM m/z 274 (M+H) $^+$.

Etapla 26F

Preparación de éster etílico del ácido 1-[[1-(5-aliloxi-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanoil)-4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico

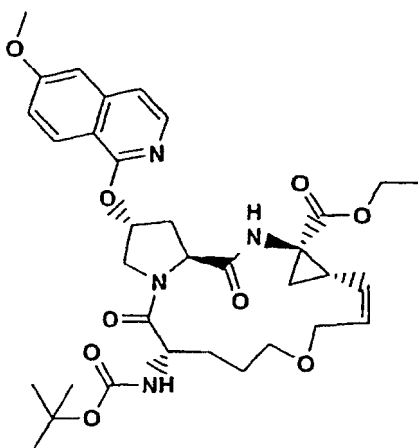


ES 2 320 771 T3

Una solución de diclorhidrato de éster etílico del ácido 1-[[4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinil-ciclopropanocarboxílico (Ejemplo 22) (3,60 g, 7,25 mmol) y ácido 5-aliloxi-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanoico (el producto de la etapa 26E, 1,98 g, 7,25 mmol) en 75 ml de DMF se trató con HATU (3,31 g, 8,7 mmol) y N-metilmorfolina (2,79 ml, 25,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 4 h y después se inactivó con tampón a pH 4 (biftalato). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaCl ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 10-60%/hexano) dio 3,91 g (~79%) de éster etílico del ácido 1-[[1-(5-aliloxi-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanoil)-4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinil-ciclopropanocarboxílico en forma de una espuma colapsada de color amarillo: ¹H RMN (500 MHz, METANOL-D₄) δ 1,05-1,16 (m, 1 H), 1,32 (s, 9 H), 1,37-1,50 (m, 3 H), 1,51-1,67 (m, 3 H), 1,68-1,84 (m, 2 H), 2,17-2,30 (m, 1 H), 2,32-2,50 (m, 1 H), 2,58-2,73 (m, 1 H), 2,80 (s, 1 H), 3,33-3,52 (m, 2 H), 3,86-3,95 (m, 5 H), 4,00-4,06 (m, 1 H), 4,07-4,22 (m, 3 H), 4,23-4,38 (m, 1 H), 4,58-4,67 (m, 1 H), 5,04-5,17 (m, 2 H), 5,18-5,34 (m, 2 H), 5,65-5,94 (m, 3 H), 7,07-7,28 (m, 3 H), 7,82-7,92 (m, 1 H), 7,96-8,13 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,75 min), EM *m/z* 681 (M⁺+1).

Etapas 26G

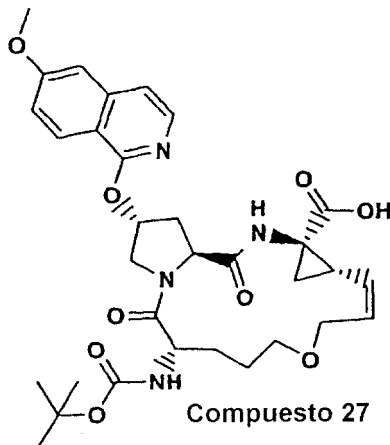
Preparación de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-di-aza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4 carboxílico



Una solución de éster etílico del ácido 1-[[1-(5-aliloxi-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanoil)-4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico (el producto de la etapa 26F, 2,0 g, 2,94 mmol) en 800 ml de benceno se trató con catalizador de Grubb de segunda generación (375 mg, 0,44 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C, se agitó en una atmósfera de N₂ durante 2 h y después se concentró al vacío. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 25-100%/hexano) y el tratamiento con carbono activado dieron 677,6 mg (~35%) de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de una espuma colapsada de color pardo: ¹H RMN (500 MHz, METANOL-D₄) δ 1,06-1,30 (m, 12 H), 1,51-2,03 (m, 6 H), 2,41-2,70 (m, 3 H), 3,39-3,50 (m, 1 H), 3,51-3,61 (m, 1 H), 3,77-3,87 (m, 1 H), 3,92 (s, 3 H), 4,02-4,18 (m, 3 H), 4,24 (d, *J* = 6,41 Hz, 1 H), 4,36-4,48 (m, 1 H), 4,55 (d, *J* = 11,29 Hz, 1 H), 4,65 (t, *J* = 8,39 Hz, 1 H), 5,55-5,72 (m, 2 H), 5,85 (s, 1 H), 7,08 (d, *J* = 8,85 Hz, 1 H), 7,17 (s, 1 H), 7,24 (d, *J* = 5,80 Hz, 1 H), 7,89 (d, *J* = 5,80 Hz, 1 H), 8,16 (d, *J* = 9,16 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,58 min), EM *m/z* 653 (M⁺+1).

Etapa 26H

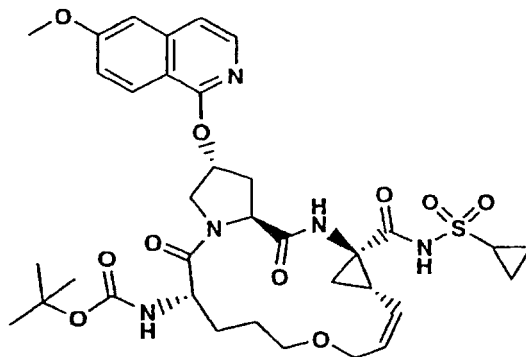
Preparación del Compuesto 27, ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



A una solución de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-di-aza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (el producto de la etapa 26G, 667 mg, 1,02 mmol) en 25,7 ml de THF se le añadieron 2,9 ml de agua, 11,4 ml de metanol e hidróxido de litio en polvo (489 mg, 20,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 6 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y 20,4 ml de HCl ac. 1 N. A la solución resultante se le añadió tampón a pH 4 (biftalato). La fase orgánica se lavó con agua y NaCl ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 0-10%/cloroformo) dio 446 mg (~70%) de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de una espuma colapsada de color ligeramente rosa: ¹H RMN (500 MHz, METANOL-D₄) δ 0,99-1,16 (m, 1 H), 1,22 (s, 9 H), 1,50-2,04 (m, 6 H), 2,40-2,73 (m, 3 H), 3,41-3,50 (m, 1 H), 3,51-3,62 (m, 1 H), 3,73-3,86 (m, 1 H), 3,90 (s, 3 H), 4,03 (d, J = 10,52 Hz, 1 H), 4,21 (d, J = 8,31 Hz, 1 H), 4,42-4,72 (m, 3 H), 5,65 (s, 2 H), 5,82 (s, 1 H), 7,06 (d, J = 9,05 Hz, 1 H), 7,15 (s, 1 H), 7,22 (d, J = 5,87 Hz, 1 H), 7,87 (m, J = 9,29 Hz, 2 H), 8:14 (d, J = 8,56 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,46 min), EM m/z 625 (M⁺+1).

Etapa 26I

Preparación del Compuesto 28, éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

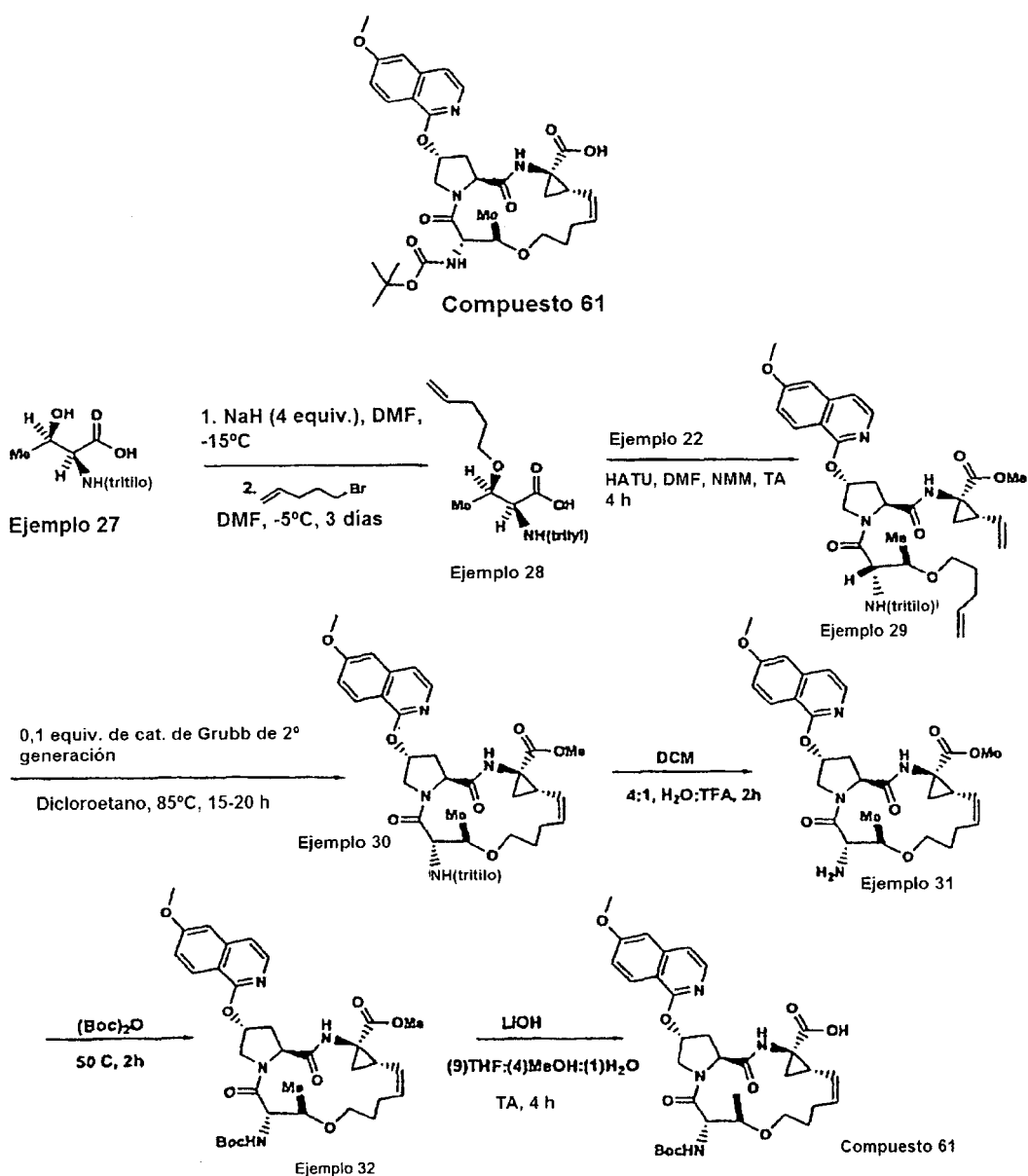


Compuesto 28

Una solución de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (el producto de la etapa 26H, 146,5 mg, 0,235 mmol) y carbonildiimidazol (76 mg, 0,47 mmol) en 5 ml de THF se agitó a la temperatura de reflujo en una atmósfera de N₂

durante 2 h y después se dejó volver a la ta. A la mezcla de reacción se le añadieron amida del ácido ciclopropanosulfónico (86 mg, 0,71 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (81 μ l, 0,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 4 h y después se inactivó con tampón a pH 4 (bifalato). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaCl ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 0-8%/cloroformo) dio 111,7 mg (~65%) de éster terc-butílico del ácido [4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-10-oxa-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico (compuesto 27) en forma de un polvo de color blanco: ¹H RMN (500 MHz, METANOL-D₄) δ 0,96-1,17 (m, 6 H), 1,20 (s, 9 H), 1,24-1,32 (m, 1 H), 1,49-1,64 (m, 2 H), 1,65-1,79 (m, 2 H), 1,79-2,06 (m, 2 H), 2,45-2,60 (m, 1 H), 2,62-2,76 (m, 2 H), 2,86-2,98 (m, 1 H), 3,47-3,61 (m, 2 H), 3,62-3,73 (m, 1 H), 3,92 (s, 3 H), 4,00 (d, J = 10,38 Hz, 1 H), 4,18 (d, J = 10,99 Hz, 1 H), 4,55-4,72 (m, 3 H), 5,44 (t, J = 9,92 Hz, 1 H), 5,69-5,78 (m, 1 H), 5,86 (s, 1 H), 7,07 (d, J = 7,02 Hz, 1 H), 7,17 (s, 1 H), 7,24 (d, J = 5,80 Hz, 1 H), 7,85-7,95 (m, 2 H), 8,18 (d, J = 8,85 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento B, tiempo de retención: 1,52 min), EM m/z 728 (M⁺+1).

Preparación del Compuesto 61



La preparación del Compuesto 61 se realizó como se ha mostrado en el esquema anterior y usando los procedimientos que se indican a continuación:

Preparación de Ejemplo 28

El Ejemplo 28 se preparó añadiendo una solución en DMF de treonina protegida con N-tritilo a una solución en DMF de hidruro sódico enfriada a -15°C . La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a -15°C , después de lo cual se añadió 5-bromo-1-penteno y la mezcla resultante se calentó a -5°C . La mezcla de reacción se mantuvo a -5°C durante 3 días, tiempo después del cual la reacción se interrumpió mediante la adición de HCl acuoso 1 N y se trató usando procedimientos de extracción convencionales como se ha descrito anteriormente. El Ejemplo 28 se obtuvo en forma pura por procedimientos de cromatografía convencionales.

Preparación de Ejemplo 29

El Ejemplo 29 se preparó por acoplamiento del Ejemplo 28 con el Ejemplo 22 como se muestra en el esquema usando el procedimiento general descrito anteriormente para la preparación de Compuestos y Ejemplos relacionados estructuralmente.

Preparación de Ejemplo 30

El Ejemplo 30 se preparó a partir del Ejemplo 29 como se muestra en el esquema usando procedimientos descritos anteriormente para la preparación de Compuestos y Ejemplos relacionados estructuralmente.

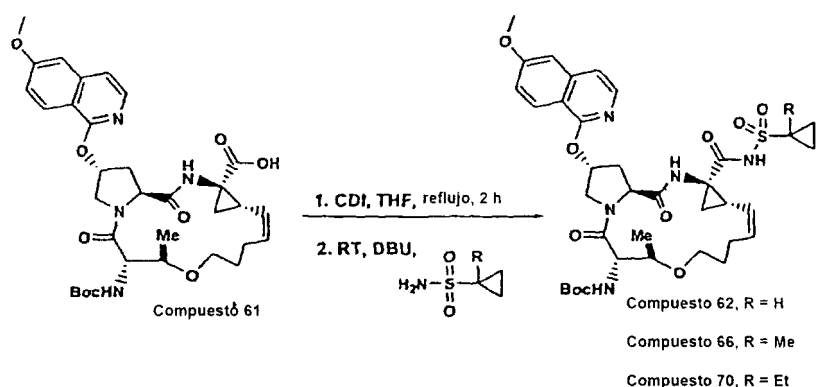
Preparación de Ejemplo 31

El Ejemplo 31 se preparó a partir del Ejemplo 30 como se muestra en el esquema. En este caso, se disolvieron 100 mg del Ejemplo 30 se en 2 ml de DCM y la solución resultante se trató con 82 microlitros de una solución 4:1 de agua y ácido trifluoroacético. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante varias horas, después de lo cual la mezcla de reacción se concentró y la mezcla del producto en bruto resultante se purificó por cromatografía para proporcionar el Ejemplo 31.

Preparación del Compuesto 61

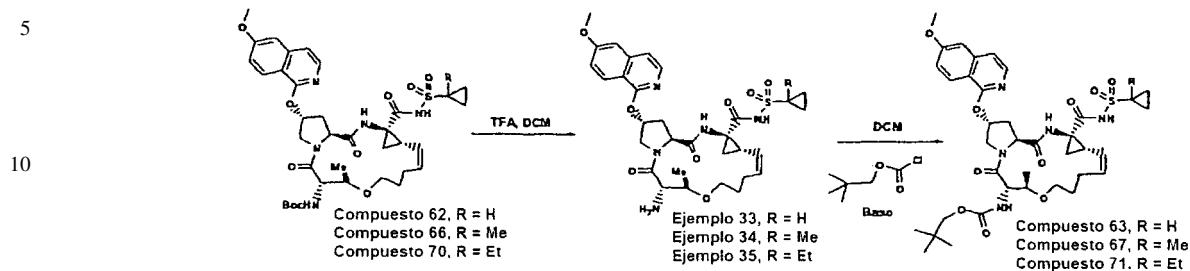
El Compuesto 61 se preparó a partir del Ejemplo 31 como se muestra en el esquema y usando procedimientos descritos anteriormente para la preparación de Compuestos y Ejemplos relacionados.

Preparación del Compuesto 62, el Compuesto 66 y el Compuesto 70

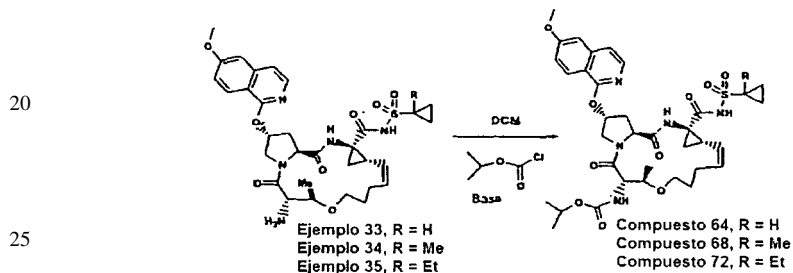


El Compuesto 62 se preparó a partir del Compuesto 61 como se muestra en el esquema, y usando los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de Compuestos y Ejemplos relacionados.

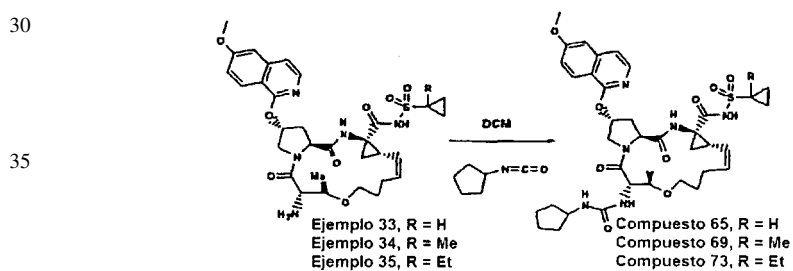
Preparación de Compuestos 63, 64, 65, Compuestos 67, 68, 69, Compuestos 71, 72, 73



Preparación del Compuesto 64, Compuesto 68, Compuesto 72



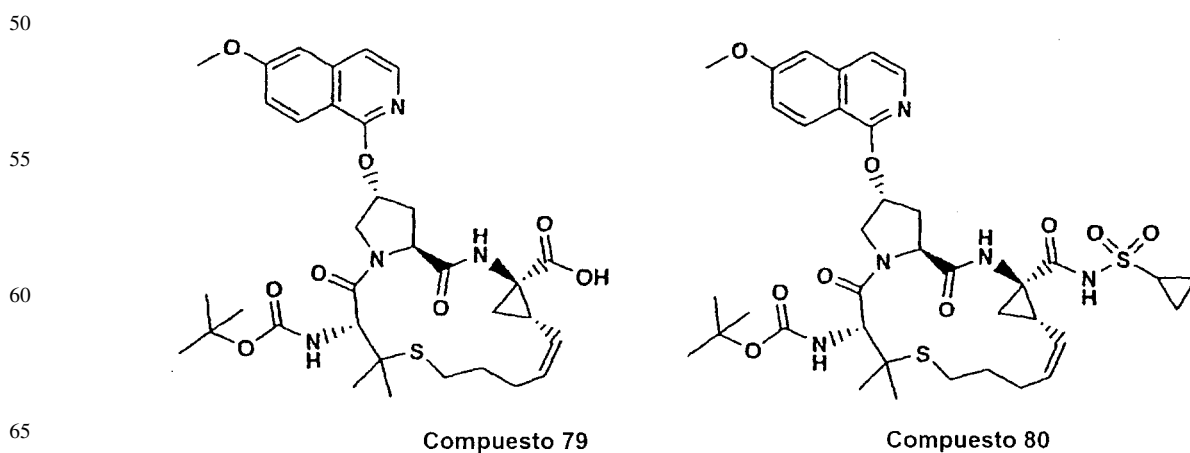
Preparación del Compuesto 65, Compuesto 69, Compuesto 73



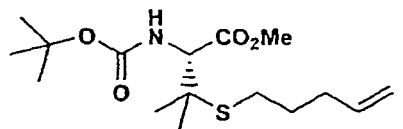
Los compuestos 63, 64, 65, 67, 68, 69, 71, 72 y 73 se prepararon como se ha mostrado en el esquema sintético anterior, y usando procedimientos descritos en este documento para la síntesis de Ejemplos y Compuestos relacionados.

Ejemplo 36

Preparación del Compuesto 79 y el Compuesto 80



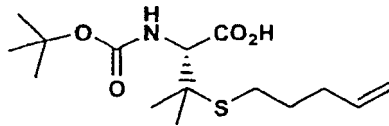
Etapa 36A

Preparación de *N*-*t*-butoxicarbonil-3-(4-penteniltio)-*L*-valina, éster metílico

A una solución de 7,12 g (48 mmol, 1,0 equiv.) de *L*-penicilamina en 100 ml de 1,4-dioxano y 25 ml de agua a temperatura ambiente se le añadieron 9,60 ml (96 mmol, 2,0 equiv.) de una solución acuosa 10 N de hidróxido sódico, seguido de la adición gota a gota de 12,00 ml (101 mmol, 2,1 equiv.) de 5-bromo-1-penteno durante unos minutos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 68 horas. En este punto, se añadieron 12,50 g (57 mmol, 1,2 equiv.) de dicarbonato de di-*tert*-butilo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas más. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se disolvió en agua. La mezcla acuosa se lavó con éter dietílico, se ajustó a pH 3 empleando ácido clorhídrico 1 N y después se extrajo con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío.

El producto en bruto (12,20 g) se disolvió en 120 ml de dimetilsulfóxido anhidro. A esta solución se le añadieron 10,50 g (76 mmol) de carbonato potásico y 4,70 ml (76 mmol) de yodometano y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con agua (2 x) y salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (elución: acetato de etilo al 2-10%/hexano) proporcionó 8,54 g de *N*-*tert*-butoxicarbonil-3-(4-penteniltio)-*L*-valina, éster metílico en forma de un aceite incoloro. RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,76 (d de d de t, 1 H, $J = 17,2, 10,3, 6,6$ Hz), 5,35 (d a, 1 H, $J = 9,0$ Hz), 5,05-4,94 (m, 2 H), 4,27 (d a, 1 H, $J = 9,0$ Hz), 3,73 (s, 3 H), 2,52 (m, 2 H), 2,13 (cuadr., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,61 (quint., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,43 (s, 9 H), 1,35 (s, 3 H), 1,33 (s, 3 H).

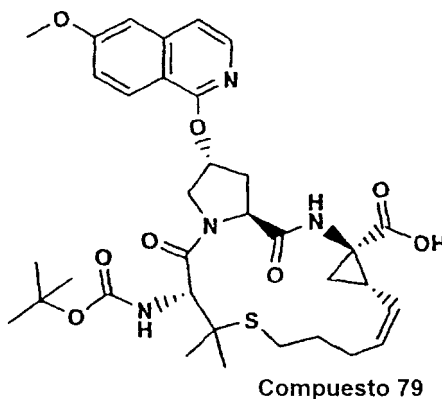
Etapa 36B

Preparación de *N*-*tert*-butoxicarbonil-3-(4-penteniltio)-*L*-valina

A una solución de 8,52 g (25,7 mmol) de *N*-*tert*-butoxicarbonil-3-(4-penteniltio)-*L*-valina, éster metílico en 200 ml de tetrahidrofurano a temperatura ambiente se le añadió una solución de 1,10 g (26,2 mmol) de hidróxido de litio monohidrato en 50 ml de agua. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 65 horas. Después, a la mezcla de reacción se le añadieron 28 ml de ácido clorhídrico 1,00 N. La mezcla se diluyó con éter dietílico, se lavó con agua (3 x) y salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío para producir 8,10 g de *N*-*tert*-butoxicarbonil-3-(4-penteniltio)-*L*-valina en forma de un aceite incoloro. RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,75 (d de d de t, 1 H, $J = 17,2, 10,3, 6,6$ Hz), 5,40 (s a, 1 H), 5,05-4,94 (m, 2 H), 4,28 (s a, 1 H), 2,56 (m, 2 H), 2,13 (cuadr., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,63 (quint., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,44 (s, 9 H), 1,39 (s, 3 H), 1,37 (s, 3 H).

Etapa 36C

Preparación de ácido (1*S*, 4*R*, 6*S*, 14*R*, 18*R*)-7-*cis*-14-*tert*-butoxicarbonilamino-13,13-dimetil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-12-*tia*-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (Compuesto 79)

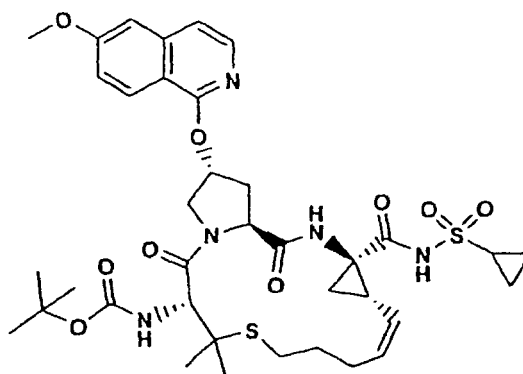


ES 2 320 771 T3

Este compuesto se preparó a partir de N-terc-butoxicarbonil-3-(4-pentenitio)-L-valina empleando los procedimientos descritos en el ejemplo 24. ESI-espectro de masas: m/e: 669 (M+H)⁺, 667 (M-H)⁻; espectro de masas de alta resolución: calc. para C₃₄H₄₅N₄O₈S: 669,2958, encontrado: 669,2975; RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,06 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 7,90 (d, 1 H, J = 5,8 Hz), 7,24 (d, 1 H, J = 5,8 Hz), 7,16 (s, 1 H), 7,09 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 6,69 (d, 1 H, J = 8,5 Hz), 5,80 (s, 1 H), 5,72 (cuadr., 1 H, J = 8,5 Hz), 5,46 (t, 1 H, J = 8,5 Hz), 4,71 (t, 1 H, J = 8,5 Hz), 4,64 (d, 1 H, J = 9,1 Hz), 4,45 (d, 1 H, J = 11,6 Hz), 4,22 (m, 1 H), 3,91 (s, 3 H), 2,78 (m, 1 H), 2,74-2,68 (m, 2 H), 2,56 (m, 1 H), 2,36-2,28 (m, 2 H), 2,21 (m, 1 H), 1,75 (m, 1 H), 1,72-1,64 (m, 2 H), 1,60 (m, 1 H), 1,45 (s, 3 H), 1,39 (s, 3 H), 1,21 (s, 9 H).

Etapa 36D

Preparación de ácido (1S, 4R, 6S, 14R, 18R)-[7-cis-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-13,13-dimetil-18-(6-metoxiisquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-12-tia-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]carbámico, éster terc-butílico (Compuesto 80)

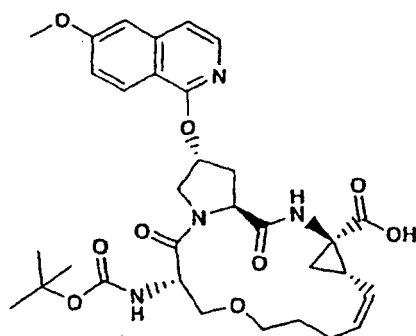


Compuesto 80

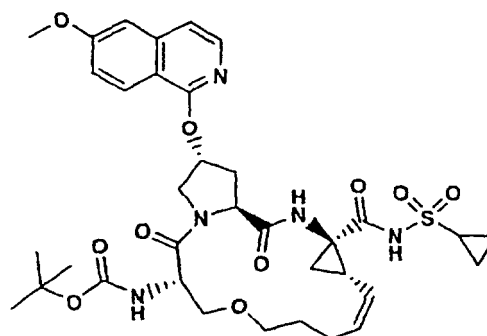
Este compuesto se preparó a partir del compuesto 79 empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 24D. ESI-espectro de masas: m/e: 772 (M+H)⁺, 770 (M-H)⁻; espectro de masas de alta resolución: calc. para C₃₇H₅₀N₅O₆S₂: 772,3050, encontrado: 772,3060; RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,06 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 7,90 (d, 1 H, J = 5,8 Hz), 7,24 (d, 1 H, J = 5,8 Hz), 7,17 (s, 1 H), 7,08 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 6,62 (d, 1 H, J = 8,5 Hz), 5,83 (s, 1 H), 5,74 (cuadr., 1 H, J = 8,5 Hz), 5,26 (t, 1 H, J = 8,5 Hz), 4,67 (m, 1 H), 4,46 (m, 2H), 4,19 (m, 1 H), 3,92 (s, 3 H), 2,93 (m, 1 H), 2,74-2,67 (m, 3 H), 2,58-2,48 (m, 3 H), 2,11 (m, 1 H), 1,82-1,75 (m, 2 H), 1,61 (m, 1 H), 1,54 (m, 1 H), 1,45 (s, 3 H), 1,37 (s, 3 H), 1,27 (m, 1 H), 1,18 (s, 9 H), 1,09 (m, 1 H), 1,07-0,99 (m, 2 H).

Ejemplo 37

Preparación del Compuesto 84 y Compuesto 85

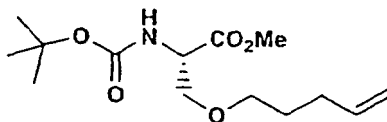


Compuesto 84



Compuesto 85

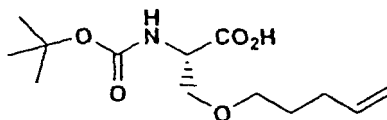
Etapa 37A

Preparación de N-terc-butoxicarbonil-O-(4-pentenil)-L-serina, éster metílico

A una solución de 10,26 g (50 mmol, 1,0 equiv.) de N-terc-butoxicarbonil-L-serina en 500 ml de dimetilsulfóxido anhidro a temperatura ambiente se le añadieron 2,00 g (50 mmol, 1,0 equiv.) de hidruro sódico al 60% en aceite mineral. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas hasta que cesó el desprendimiento de gas. A la solución resultante se le añadieron 6,00 ml (50 mmol, 1,0 equiv.) de 5-bromo-1-penteno seguido inmediatamente de 2,00 g más (50 mmol, 1,0 equiv.) de hidruro sódico al 60% en aceite mineral. Después, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se diluyó con 2000 ml de agua, se ajustó a pH 3-4 mediante la adición de 50 ml de ácido clorhídrico 1,00 N y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua (2 x) y salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío. Para retirar el aceite mineral residual, el material de partida se disolvió en una solución acuosa diluida de hidróxido sódico. Esta solución acuosa se lavó con hexano y después se ajustó a pH 4 empleando ácido clorhídrico y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con agua (2 x) y salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío.

El producto en bruto (7,70 g) se disolvió en 100 ml de dimetilsulfóxido anhidro. A esta solución se le añadieron 7,80 g (56 mmol) de carbonato potásico y 3,50 ml (56 mmol) de yodometano y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con agua (2 x) y salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (elución: acetato de etilo al 2-10%/hexano) proporcionó 6,70 g de N-terc-butoxicarbonil-O-(4-pentenil)-L-serina, éster metílico en forma de un aceite incoloro. RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,78 (d de d de t, 1 H, $J = 17,2, 10,2, 6,6$ Hz), 5,34 (d a, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 5,03-4,92 (m, 2 H), 4,40 (m, 1 H), 3,81 (d de d, 1 H, $J = 9,5, 2,9$ Hz), 3,74 (s, 3 H), 3,61 (d de d, 1 H, $J = 9,5, 3,5$ Hz), 3,42 (m, 2 H), 2,06 (cuadr., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,61 (quint., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,44 (s, 9 H).

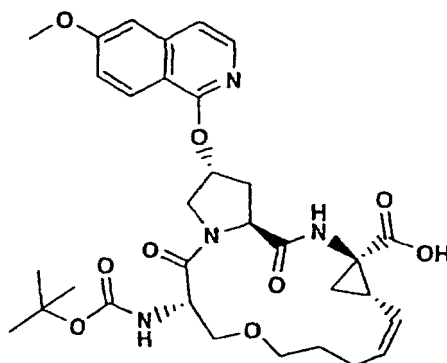
Etapa 37B

Preparación de N-terc-butoxicarbonil-O-(4-pentenil)-L-serina

A una solución de 6,65 g (23 mmol) de N-terc-butoxicarbonil-O-(4-pentenil)-L-serina, éster metílico en 500 ml de tetrahidrofurano a temperatura ambiente se le añadió una solución de 1,95 g (46 mmol) de hidróxido de litio monohidrato en 100 ml de agua. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas. Después, a la mezcla de reacción se le añadieron 46 ml de ácido clorhídrico 1,00 N. La mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua (3 x) y salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío para producir 6,30 g de N-terc-butoxicarbonil-O-(4-pentenil)-L-serina en forma de un aceite incoloro. RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,77 (d de d de t, 1 H, $J = 17,2, 10,2, 6,6$ Hz), 5,37 (d a, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 5,03-4,92 (m, 2 H), 4,42 (m, 1 H), 3,87 (d de d, 1 H, $J = 9,5, 2,6$ Hz), 3,63 (d de d, 1 H, $J = 9,5, 4,0$ Hz), 3,45 (t, 2 H, $J = 6,6$ Hz), 2,07 (cuadr., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,64 (quint., 2 H, $J = 7,3$ Hz), 1,44 (s, 9 H).

Etapa 37C

Preparación de ácido (1*S*, 4*R*, 6*S*, 14*S*, 18*R*)-7-*cis*-14-*terc*-butoxicarbonilamino-18-(6-metoxiisoquinolin-1-ilo)-2,15-dioxo-12-oxa-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-eno-4-carboxílico (Compuesto 84)

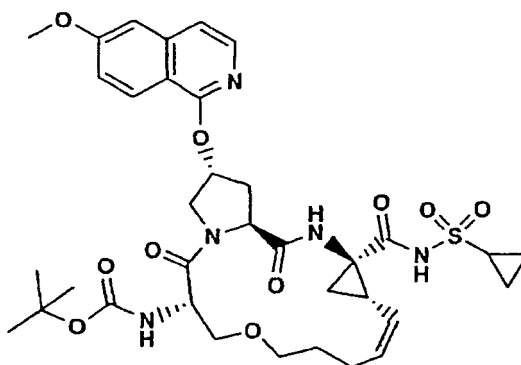


Compuesto 84

Este compuesto se preparó a partir de N-*terc*-butoxicarbonil-3-(4-pentenil)-L-valina empleando los procedimientos descritos en el ejemplo 26. ESI-espectro de masas: m/e : 625 ($M+H$)⁺, 623 ($M-H$)⁻; espectro de masas de alta resolución: calc. para C₃₂H₄₁N₄O₉: 625,2874, encontrado: 625,2871; RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,12 (d, 1 H, $J = 9,0$ Hz), 7,89 (d, 1 H, $J = 5,8$ Hz), 7,24 (d, 1 H, $J = 5,8$ Hz), 7,17 (s, 1 H), 7,12 (d, 1 H, $J = 9,0$ Hz), 5,83 (s, 1 H), 5,63 (cuadr., 1 H, $J = 8,8$ Hz), 5,45 (t, 1 H, $J = 8,8$ Hz), 4,74 (m, 1 H), 4,60 (s, 1 H), 4,36 (d, 1 H, $J = 11,0$ Hz), 4,16 (d, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 3,91 (s, 3 H), 3,74 (m, 2 H), 3,62 (m, 1 H), 3,49 (m, 1 H), 2,66 (m, 1 H), 2,57 (m, 1 H), 2,47-2,33 (m, 2 H), 2,19 (m, 1 H), 1,78 (m, 2 H), 1,69 (m, 1 H), 1,48 (m, 1 H), 1,30 (s, 9 H).

Etapa 37D

Preparación de ácido (1*S*, 4*R*, 6*S*, 14*S*, 18*R*)-[7-*cis*-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(6-metoxi-isoquinolin-1-ilo)-2,15-dioxo-12-oxa-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]-nonadec-7-en-14-il]-carbámico, éster *terc*-butílico (Compuesto 85)

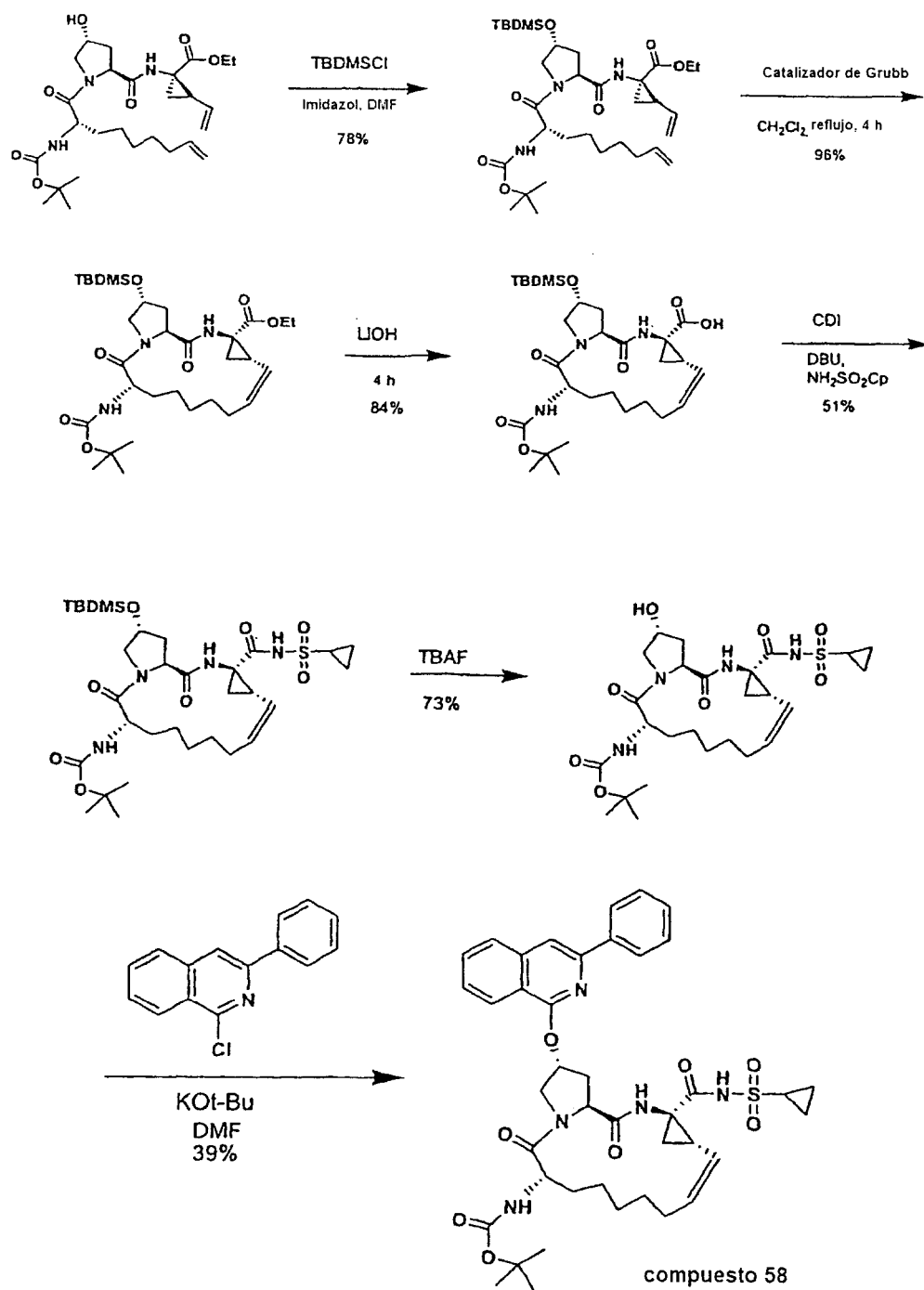


Compuesto 85

Este compuesto se preparó a partir del compuesto 84 empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 26I. ESI-espectro de masas: m/e : 728 ($M+H$)⁺, 726 ($M-H$)⁻; espectro de masas de alta resolución: calc. para C₃₅H₄₆N₅O₁₀S: 728,2966, encontrado: 728,2972; RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,12 (m, 1 H), 7,89 (d, 1 H, $J = 5,8$ Hz), 7,25 (d, 1 H, $J = 5,8$ Hz), 7,18 (s, 1 H), 7,12 (d, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 5,89 (s, 1 H), 5,66 (cuadr., 1 H, $J = 8,8$ Hz), 5,19 (t, 1 H, $J = 8,8$ Hz), 4,71 (m, 1 H), 4,52 (s, 1 H), 4,36 (d, 1 H, $J = 10,0$ Hz), 4,12 (m, 1 H), 3,92 (s, 3 H), 3,65 (m, 2 H), 3,47 (m, 2 H), 2,92 (m, 1 H), 2,64 (m, 1 H), 2,56 (m, 1 H), 2,45 (m, 2 H), 2,19 (m, 1 H), 1,77 (m, 1 H), 1,70-1,60 (m, 2 H), 1,54 (m, 1 H), 1,28 (s, 9 H), 1,15-0,98 (m, 4 H).

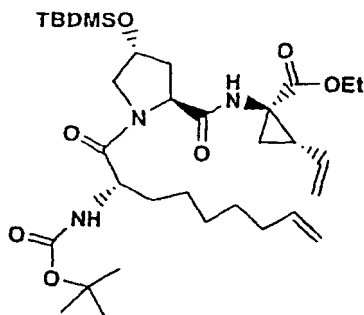
Ejemplo 38

Preparación del Compuesto 58



Etapa 38a

Preparación de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(terc-butildimetil-silanilo)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico

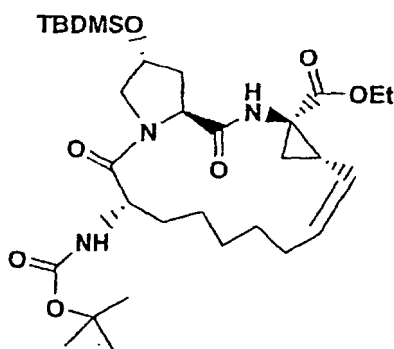


A una mezcla de éster etílico del ácido 1-[[1-(2(*S*)-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxipirrolidina-2(*S*)-carbonil]-(*1R*)-amino]-2(*S*)-vinil-ciclopropanocarboxílico (1,5 g, 2,87 mmol) en 10 ml de DMF se le añadieron imidazol (0,25 g, 3,67 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (516 mg, 3,44 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. Después, la mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para obtener un sólido en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 20% en hexano) dio 1,43 g (78%) de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(terc-butildimetil-silanilo)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico en forma de un sólido de color blanco.

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 0,10 (s, 6 H), 0,89 (s, 9 H), 1,22 (m, 3 H), 1,31-1,48 (m, 16 H), 1,50-1,75 (m, 3 H), 2,06 (m, 3 H), 2,11-2,33 (m, 2 H), 3,70 (m, 2 H), 4,03-4,19 (m, 2 H), 4,21 (m, 1 H), 4,45 (t, $J = 7,87$ Hz, 1 H), 4,59 (m, 1 H), 4,91 (d, $J = 9,15$ Hz, 1 H), 4,98 (d, $J = 17,20$ Hz, 1 H), 5,08 (dd, $J = 10,25, 1,83$ Hz, 1 H), 5,27 (dd, $J = 17,38, 1,65$ Hz, 1 H), 5,65-5,87 (m, 2 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 4,00 min), EM m/z 636 ($\text{M}^+ + 1$).

Etapa 38b

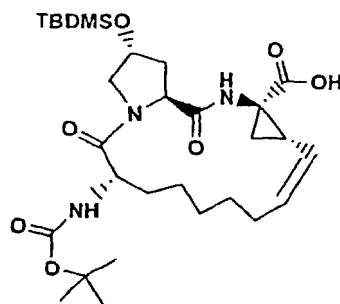
Preparación de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico, éster etílico



A una solución de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-terc-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(terc-butildimetil-silanilo)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico (1,63 g, 2,56 mmol) en 640 ml de cloruro de metileno se le añadieron 215 mg (0,26 mmol) de dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-tri[bencilideno]rutenio (IV). La mezcla se calentó a reflujo durante 15 min. El residuo se concentró al vacío y después se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 30%/hexano. Para decolorar adicionalmente la muestra, el producto en bruto se cromatografió una segunda vez eluyendo con éter al 50% en hexano para dar 1,5 g (96%) de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (500 MHz, CD_3Cl) δ 0,06 (s, 3 H), 0,07 (s, 3 H), 0,86 (s, 9 H), 1,18-1,24 (m, 6 H), 1,34-1,64 (m, 14 H), 1,86-1,96 (m, 3 H), 2,02-2,09 (m, 1 H), 2,11-2,17 (m, 1 H), 2,19-2,28 (m, 1 H), 2,57-2,63 (m, 1 H), 3,50-3,54 (m, 1 H), 3,71 (dd, $J = 10,22, 6,26$ Hz, 1 H), 4,06-4,17 (m, 2 H), 4,52-4,58 (m, 2 H), 4,75 (d, $J = 8,55$ Hz, 1 H), 5,21 (t, $J = 9,92$ Hz, 1 H), 5,35 (d, $J = 7,63$ Hz, 1 H), 5,45-5,50 (m, 1 H), 6,94 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,88 min), EM m/z 608 ($\text{M}^+ + 1$).

Etapa 38c

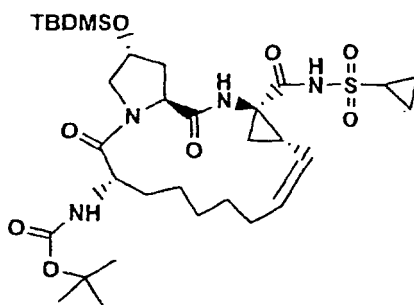
Preparación de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butil-dimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



A una solución de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butil-dimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (1,5 g, 2,47 mmol) en un sistema disolvente mixto de THF (4 ml), metanol (1 ml) y agua (2 ml), se le añadió hidróxido de litio monohidrato en polvo (1,0 g, 50 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 4 h. Después, la mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta que alcanzó pH 4. Esta solución ácida se extrajo con EtOAc (3 x). Los extractos de EtOAc combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 1,2 g (84%) de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butil-dimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) 0,12 (s, 6 H), 0,89 (s, 9 H), 1,23-1,64 (m, 17 H), 1,70-1,87 (m, 1 H), 1,90-2,49 (m, 6 H), 3,70-3,80 (m, 1 H), 3,83-3,90 (m, 1 H), 4,28-4,36 (m, 1 H), 4,47-4,55 (m, 1 H), 4,65 (s, 1 H), 5,30-5,39 (m, 1 H), 5,53-5,62 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,69 min), EM *m/z* 580 (M⁺+1).

Etapa 38d

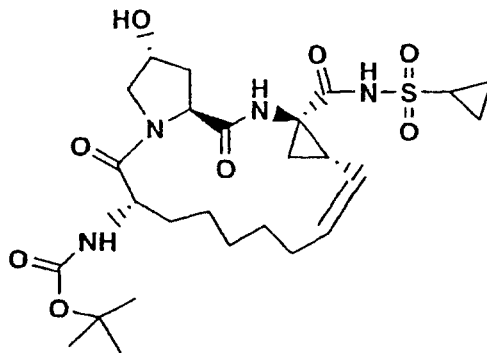
Preparación de éster terc-butílico del ácido [18-(terc-butil-dimetil-silanilo)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-di-azatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Se disolvió ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butil-dimetil-silanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (500 mg, 0,86 mmol) en 25 ml de THF y se trató con CDI (180 mg, 1,12 mmol). (Debe tenerse cuidado para evitar la humedad usando cristalería secada al horno y manteniendo una atmósfera de N₂ seca). Después de calentar a reflujo la mezcla de reacción durante 2 h, se enfrió a ta y se trató secuencialmente con ciclopropilsulfonamida (135 mg, 1,12 mmol) y DBU (170 mg, 1,12 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a ta y el THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. Después, se purificó por cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 33% en hexano) para dar 300 mg (51%) de éster terc-butílico del ácido [18-(terc-butildimetil-silanilo)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diazatriciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 1H 0,07 (s, 3 H), 0,08 (s, 3 H), 0,85 (s, 9 H), 0,87-1,49 (m, 21 H), 1,73-1,95 (m, 3 H), 2,08-2,16 (m, 1 H), 2,25-2,36 (m, 2 H), 2,42-2,56 (m, 1 H), 2,85-2,93 (m, 1 H), 3,65-3,74 (dd, *J* = 10,61, 3,66 Hz, 1 H), 3,89 (d, *J* = 10,25 Hz, 1 H), 4,34 (m, *J* = 9,70, 9,70 Hz, 1 H), 4,43 (t, *J* = 7,87 Hz, 1 H), 4,57 (s, 1 H), 4,94-5,01 (m, 1 H), 5,10 (d, *J* = 8,78 Hz, 1 H), 5,66-5,75 (m, 1 H), 6,55 (s, 1 H), 10,13 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,81 min), EM *m/z* 683 (M⁺+1).

Etapa 38e

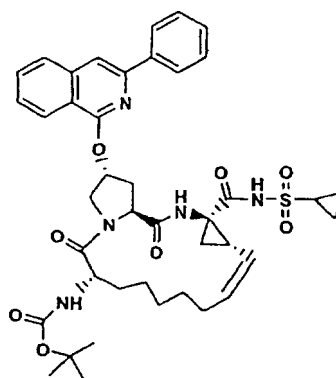
Éster *terc*-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo [14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico



A una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido [18-(*terc*-butil-dimetilsilanilo)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico (330 mg, 0,48 mmol) en 25 ml de THF se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (150 mg, 0,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 18 h y después de THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. Después, se purificó por trituración con hexano para producir 200 mg (73%) de éster *terc*-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl) δ 1,87-1,64 (m, 21 H), 1,70-1,98 (m, 3 H), 2,15-2,56 (m, 5 H), 2,85-2,94 (m, 1 H), 3,71 (d, *J* = 13,91 Hz, 1 H), 4,10-4,26 (m, 2 H), 4,51 (t, *J* = 7,87 Hz, 1 H), 4,62 (s, 1 H), 4,98 (m, 1 H), 5,06 (d, *J* = 8,78 Hz, 1 H), 5,64-5,71 (m, 1 H), 6,72 (s, 1 H), 10,24 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 2,85 min), EM *m/z* 569 (M⁺+1).

Etapa 38f

Preparación del Compuesto 58: éster *terc*-butílico del ácido [(*Z*)-(1*S*,4*R*,14*S*,18*R*)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-(3-fenil-isoquinolin-1-iloxi) 3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Compuesto 58

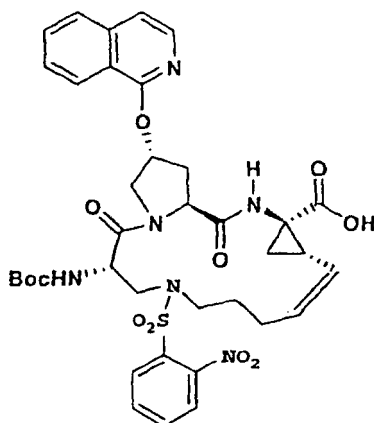
A una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico (20 mg, 0,035 mmol) en 1 ml de DMF se le añadió *t*-butoxido potásico (22 mg, 0,196 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 5 min y después se añadió 1-cloro-3-fenilisoquinolina (15 mg, 0,062 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 15 h y después se concentró al vacío. Este producto en bruto se trituró con éter. El residuo se disolvió en MeOH y después se purificó por HPLC preparativa. (YMC XTERRA, S5, 19 x 100 mm, gradiente: de 60% de B a 100% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 10 mg (39%) del Compuesto 58, éster *terc*-butílico del ácido [(*Z*)-(1*S*,4*R*,14*S*,18*R*)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-(3-fenilisoquinolin-1-iloxi)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico, en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl) δ 0,90-1,64 (m, 21 H), 1,76-1,97 (m, 3 H), 2,26-2,31 (m, 1 H), 2,52-2,63 (s a, 1 H), 2,69-2,81 (m, 2 H), 2,88-2,93 (m, 1 H), 4,11 (d, *J* = 11,60 Hz, 1 H), 4,33 (m, 1 H), 4,61 (d, *J* = 7,94 Hz, 2 H), 4,99 (t, *J* = 9,31 Hz, 1 H), 5,05 (d, *J* = 7,93 Hz, 1 H), 5,69-5,74 (m, 1 H), 6,08 (s, 1 H), 6,60 (s, 1 H), 7,38-7,47 (m, 2 H), 7,50 (t, *J* = 7,63 Hz, 2 H), 7,63 (t, *J* = 7,32 Hz, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 7,77 (d, *J* = 8,24 Hz, 1 H), 8,10

ES 2 320 771 T3

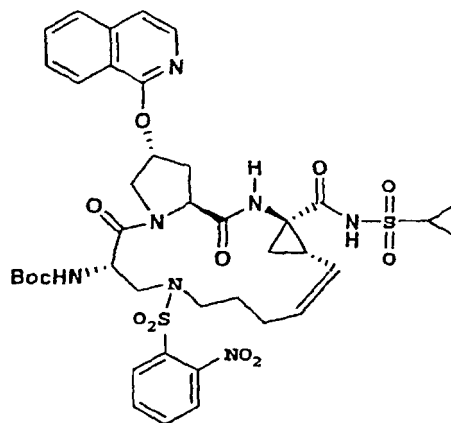
(d, $J = 7,32$ Hz, 2 H), 8,18 (d, $J = 7,93$ Hz, 1 H), 10,27 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,72 min), EM m/z 772 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 39

Preparación de los Compuestos 144 y 145



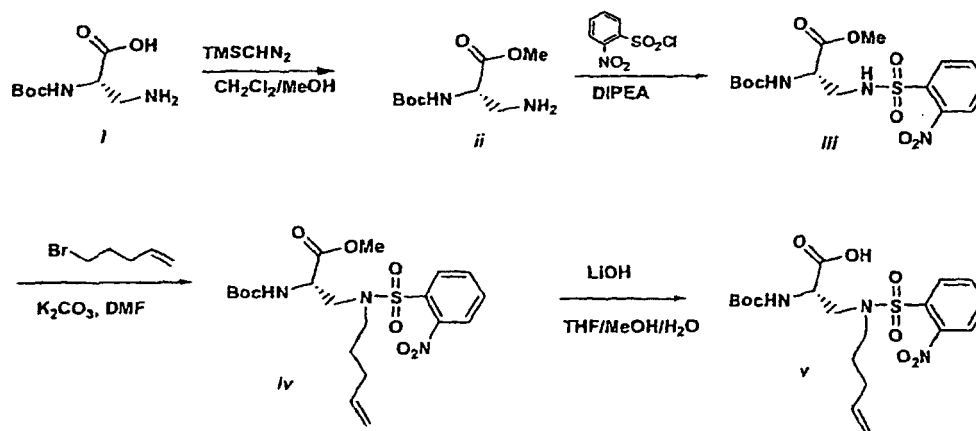
Compuesto 144



Compuesto 145

Etapa 39a

Preparación de ácido (S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoico v



Preparación de 3-amino-2-(terc-butoxicarbonil)propanoato de (S)-metilo ii

A una mezcla de i (Boc-DAP-OH) (3,0 g 14,7 mmol) en 50 ml de cloruro de metileno se le añadieron 5 ml de metanol. A esta solución se le añadió lentamente (trimetilsilil)diazometano (2 M en éter, 7,9 ml, 15,8 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 2 h hasta que se disolvió todo el sólido y la solución se volvió de color amarillo claro. Después, se concentró para producir 3,2 g (99%) de 3-amino-2-(terc-butoxicarbonil)propanoato de (S)-metilo ii en forma de un aceite incoloro. ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,46 (s, 9 H), 2,82-3,00 (m, 2 H), 3,71 (s, 3 H), 4,14 (s a, 1 H).

Preparación de 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitrofenilsulfonamido)propanoato de (S)-metilo iii

A una mezcla de 3-amino-2-(terc-butoxicarbonil)propanoato de (S)-metilo ii (1,6 g, 7,3 mmol) en DCM (50 ml) se le añadieron DIPEA (1,64 ml, 9,4 mmol) y cloruro de 2-nitrobenzo sulfonilo (1,62 g, 7,3 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 2 h. Después, se concentró, se disolvió en acetato de etilo, que se lavó después con bicarbonato sódico sat. y salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. Después, se filtró y se concentró para producir 2,9 g (98%) de 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitrofenilsulfonamido)propanoato de (S)-metilo iii en forma de una espuma de color amarillo. ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,41 (s, 9 H), 3,36-3,51 (m, 2 H), 3,71 (s, 3 H), 4,22 (m, 1 H), 7,80-7,90 (m, 3 H), 8,07-8,10 (m, 1 H).

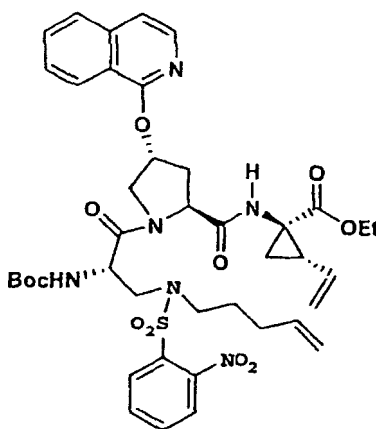
Preparación de 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoato de (S)-metilo iv

A una mezcla de 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitrofenilsulfonamido)-propanoato de (S)-metilo iii (150 mg, 0,37 mmol) en 3 ml de DMF se le añadió carbonato potásico (102 mg, 0,74 mmol). Esta mezcla se agitó a ta durante 20 min
 5 seguido de la adición de 5-bromo-1-penteno (65 μ l, 0,55 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 días. Después, se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyendo con 25% acetato de etilo en hexano) para dar 75 mg (43%) de 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoato de (S)-metilo iv en forma de un sólido de color amarillo. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1,42 (s, 9 H), 1,54-1,64 (m, 2 H), 1,97 (c, J = 7,20 Hz, 2 H), 3,37 (m, 2 H), 3,57-3,80 (m, 2 H), 3,72 (s, 3 H), 4,42 (dd, J = 8,60, 5,31 Hz, 1 H), 4,91-
 10 5,01 (m, 2 H), 5,69-5,79 (m, 1 H), 7,75-7,85 (m, 3 H), 8,04 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,68 min), EM m/z 372 (M^+ +1-Boc).

Preparación de ácido (S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoico v

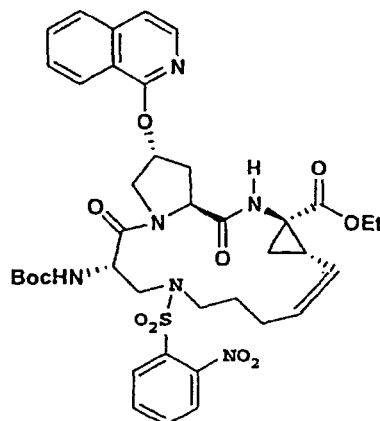
Se disolvió 2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)-propanoato de (S)-metilo iv (500 mg, 1,06 mmol) en el sistema disolvente mixto: THF (4 ml), metanol (1 ml) y agua (2 ml). Se añadió hidróxido de litio en polvo (250 mg, 10,4 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta durante 15 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta que el pH fue de 4. Esta solución ácida se extrajo cuatro veces con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 430 mg (89%) de ácido (S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoico v en forma de un aceite de color amarillo. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1,38 (s, 9 H), 1,51-1,60 (m, 2 H), 1,89-1,98 (m, 2 H), 3,28-3,32 (m, 2 H), 3,59-3,64 (dd, J = 14,95, 9,46 Hz, 1 H), 3,71-3,74 (m, 1 H), 4,33 (dd, J = 9,61, 4,43 Hz, 1 H), 4,87-4,94 (m, 2 H), 5,63-5,72 (m, 1 H), 7,71-7,77 (m, 3 H), 8,01 (dd, J = 7,48, 1,37 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,04 min),
 25 EM m/z 358 (M^+ +1-Boc).

Etapa 39b

Preparación de 1-((3R,5S)-1-((S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoil)-3-(isoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-5-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo

Se trató secuencialmente ácido (S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoico (1,10 g, 2,40 mmol) disuelto en 20 ml de DCM secuencialmente con éster etílico del ácido 1-[[4-(isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinil-ciclopropanocarboxílico, bis clorhidrato (1,27 g, 2,72 mmol), N-metil morfolina (0,92 ml, 8,34 mmol) y HATU (PE biosystems) (1,28 g, 3,36 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 15 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4 (biftalato). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat., se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar 2,0 g del producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (hexano al 30%/acetato de etilo) dio 1,4 g (70%) de 1-((3R,5S)-1-((S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoil)-3-(isoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-5-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo en forma de un sólido de color púrpura ¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ 1,23-1,31 (m, 9 H), 1,46-1,52 (m, 4 H), 1,59 (s a, 1 H), 1,66 (s a, 1 H), 1,74 (dd, J = 7,93, 5,19 Hz, 1 H), 2,00 (s a, 2 H), 2,29 (c, J = 8,95 Hz, 1 H), 2,47 (m, 1 H), 2,72 (m, 1 H), 3,38-3,51 (m, 2 H), 3,68 (m, 2 H), 4,09-4,26 (m, 3 H), 4,37 (d, J = 11,29 Hz, 1 H), 4,64 (m, 1 H), 4,72 (m, 1 H), 4,95 (d, J = 10,99 Hz, 1 H), 4,99 (dd, J = 18,92, 1,53 Hz, 1 H), 5,12 (d, J = 10,68 Hz, 1 H), 5,32 (d, J = 17,40 Hz, 1 H), 5,73-5,86 (m, 2 H), 5,92 (s, 1 H), 7,36 (m, 1 H), 7,58 (m, 1 H), 7,73 (m, 1 H), 7,80-7,88 (m, 4 H), 7,99 (m, 1 H), 8,11 (m, 1 H), 8,24 (d, J = 8,24 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 3,15 min), EM m/z 835 (M^+ +1).

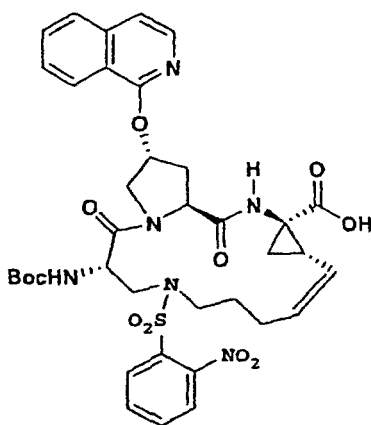
Etapa 39c



Una solución de 1-((3R,5S)-1-((S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3-(2-nitro-N-(pent-4-enil)fenilsulfonamido)propanoil)-3-(isoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-5-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo (1,40 g, 1,67 mmol) y dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno][bencilideno]rutenio (IV) (Aldrich), (204 mg, 0,24 mmol) en 1500 ml de cloruro de metileno se calentó a reflujo en una atmósfera de N_2 . Poco después de alcanzar la temperatura de reflujo, la mezcla de reacción era homogénea y de color naranja claro. Después de calentar a reflujo durante 2 h, la mezcla de reacción de color naranja oscuro se enfrió a ta y se concentró al vacío para dar 1,7 g de un aceite de color naranja. La cromatografía ultrarrápida (hexano al 30%/acetato de etilo) dio 1,1 g (82%) del éster mostrado anteriormente en forma de un sólido de color púrpura. 1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,11-1,31 (m, 12 H), 1,51-1,80 (m, 4 H), 1,97-2,15 (m, 2 H), 2,34-2,50 (m, 2 H), 2,62-2,69 (m, 1 H), 3,17-3,33 (m, 2 H), 3,44-3,60 (m, 2 H), 4,01-4,05 (m, 1 H), 4,12 (c, $J = 7,32$ Hz, 2 H), 4,37 (d, $J = 13,17$ Hz, 1 H); 4,58 (t, $J = 8,42$ Hz, 1 H), 4,71 (m, 1 H), 5,61 (m, 2 H), 5,88 (s, 1 H), 6,91 (d, $J = 9,15$ Hz, 1 H), 7,30 (d, $J = 5,49$ Hz, 1 H), 7,52 (t, $J = 7,50$ Hz, 1 H), 7,66-7,73 (m, 1 H), 7,76-7,80 (m, 4 H), 7,95 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 8,11 (d, $J = 7,32$ Hz, 1 H), 8,17 (d, $J = 8,05$ Hz, 1 H), 8,84 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,91 min), EM m/z 807 ($M^+ + 1$).

Etapa 39d

Preparación del Compuesto 144



Compuesto 144

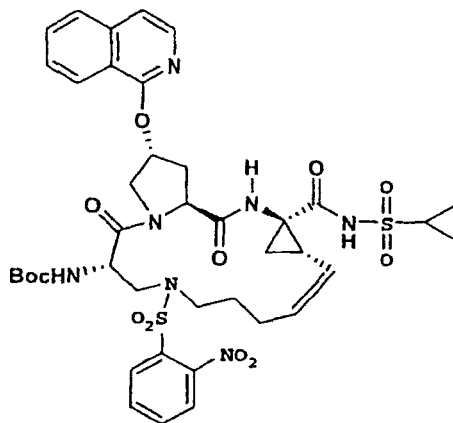
El éster etílico preparado en la etapa 39c (1,1 g, 1,3 mmol) se disolvió en el sistema disolvente mixto: THF (16 ml), metanol (4 ml) y agua (8 ml). Se añadió hidróxido de litio hidrato en polvo (540 mg, 13,2 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta durante 15 h y después se concentró al vacío. El residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta que el pH fue de 4. Esta solución ácida se extrajo cuatro veces con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron al vacío para dar 878 mg (85%) del compuesto 144 en forma de un sólido de color púrpura. 1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,11, 1,31 (s, 9 H), 1,56-1,68 (m, 4 H), 2,04-2,16 (m, 2 H), 2,42-2,66 (m, 2 H), 2,68-2,75 (m, 1 H), 3,22-3,30 (m, 2 H), 3,48-3,63 (m, 2 H), 4,02-4,14 (m, 1 H), 4,46 (d, $J = 12,44$ Hz, 1 H), 4,62 (t, $J = 8,42$ Hz, 1 H).

ES 2 320 771 T3

H), 4,70-4,73 (m, 1 H), 5,64 (m, 2 H), 5,90 (s, 1 H), 7,36 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 7,57 (t, $J = 7,68$ Hz, 1 H), 7,71-7,87 (m, 5 H), 7,98 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 8,15 (m, 1 H), 8,22 (d, $J = 8,05$ Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,78 min), EM m/z 779 ($M^+ + 1$).

Etapa 39e

Preparación del Compuesto 145

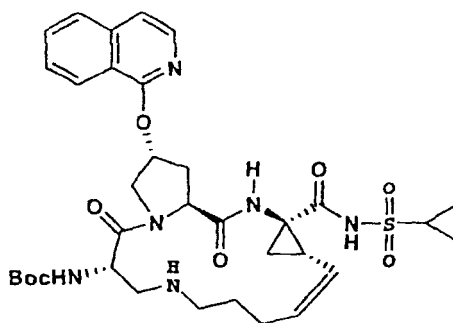


Compuesto 145

El Compuesto 144 (0,878 g, 1,1 mmol) se disolvió en 15 ml de THF y se trató con CDI (255 mg, 1,58 mmol). (Debe tenerse cuidado para evitar la humedad usando cristalería secada al horno y manteniendo una atmósfera de N_2 seca.) Después de calentar a reflujo la mezcla de reacción durante una hora, se enfrió a ta y se trató secuencialmente con ciclopropilsulfonamida (194 mg, 1,6 mmol) y DBU (245 mg, 1,6 mmol). Después de agitar durante 24 h a ta , el THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 3%/cloruro de metileno) dio 0,68 g (70%) del compuesto 145 en forma de un sólido de color blanco. 1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,07-1,37 (m, 13 H), 1,11 (s, 9 H), 1,60-1,78 (m, 4 H), 1,97-2,02 (m, 1 H), 2,28-2,35 (m, 1 H), 2,44-2,51 (m, 1 H), 2,75-2,68 (m, 1 H), 2,75-2,80 (m, 1 H), 2,94-3,00 (m, 1 H), 3,20-3,25 (m, 1 H), 3,28-3,47 (m, 2 H), 3,57-3,62 (m, 1 H), 4,05-4,08 (m, 1 H), 4,51 (d, $J = 12,21$ Hz, 1 H), 4,65-4,68 (m, 1 H), 4,84 (m, 1 H), 5,15-5,23 (m, 1 H), 5,70-5,75 (m, 1 H), 5,94 (s, 1 H), 7,35 (d, $J = 6,10$ Hz, 1 H), 7,57 (t, $J = 7,32$ Hz, 1 H), 7,74 (1, $J = 7,78$ Hz, 1 H), 7,78-7,89 (m, 4 H), 8,00 (d, $J = 5,80$ Hz, 1 H), 8,20-8,25 (m, 2 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,89 min), EM m/z 882 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 40

Preparación del Compuesto 151



Compuesto 151

A una mezcla del compuesto 145 (680 mg, 0,77 mmol) en acetonitrilo (20 ml) se le añadieron carbonato potásico (319 mg, 2,31 mmol) y benzenotiol (186 mg, 1,69 mmol). La mezcla se agitó a ta durante una noche y después se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua y esta solución acuosa se ajustó a pH 5 con HCl 1 N. Precipitó un sólido de color blanco formado en la solución. Esta mezcla heterogénea se extrajo con acetato de etilo (3 x). Los extractos combinados se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron para producir un sólido de color amarillo claro. Después,

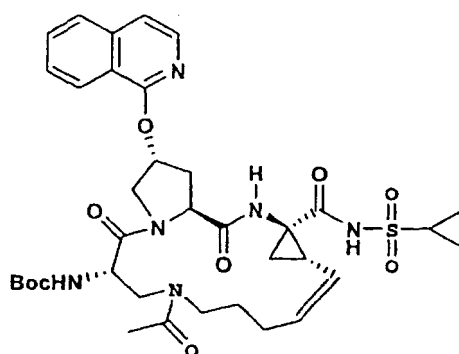
ES 2 320 771 T3

este sólido en bruto se trituró con hexano varias veces para producir 510 mg (95%) del compuesto 151 en forma de un sólido de color blanquecino.

¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1,06-1,88 (m, 13 H), 1,23, 1,31 (s, 9 H), 1,65 (dd, *J* = 9,70, 5,67 Hz, 1 H), 1,80 (dd, *J* = 8,23, 5,67 Hz, 2 H), 2,03 (s a, 1 H), 2,18 (s a, 1 H), 2,37-2,52 (m, 3 H), 2,85-2,99 (m, 2 H), 3,09-3,15 (m, 1 H), 3,27 (m, 1 H), 3,44 (m, 2 H), 4,15-4,20 (m, 1 H), 4,46 (m, 1 H), 4,74-4,85 (m, 2 H), 5,32 (t, *J* = 10,25 Hz, 1 H), 5,71 (m, 1 H), 5,98 (s a, 1 H), 7,37 (d, *J* = 5,86 Hz, 1 H), 7,58 (t, *J* = 8,23 Hz, 1 H), 7,74 (t, *J* = 7,68 Hz, 1 H), 7,85 (d, *J* = 8,05 Hz, 1 H), 8,00 (d, *J* = 5,86 Hz, 1 H), 8,22 (d, *J* = 8,05 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,01 min), EM *m/z* 697 (M⁺+1).

Ejemplo 41

Preparación del Compuesto 146

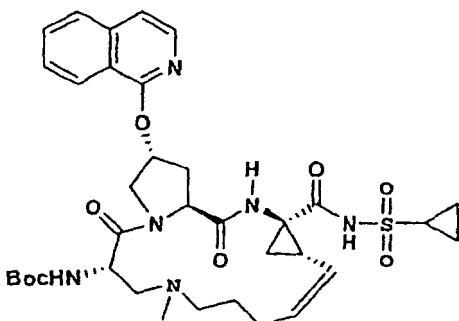


Compuesto 146

A una mezcla del compuesto 151 (20 mg, 0,029 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron trietilamina (14 mg, 0,138 mmol) y anhídrido acético (8 mg, 0,078 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 h y después se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC XTERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 45% de B a 85% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 10 mg (47%) del compuesto 146 en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz, 60°C) δ 1,08-1,22 (m, 13 H), 1,55-1,74 (m, 4 H), 2,09-2,21 (m, 2 H), 2,13 (s, 3 H), 2,33-2,48 (m, 2 H), 2,66-2,75 (m, 1 H), 2,90-2,99 (m, 1 H), 3,12-3,25 (m, 2 H), 3,45-3,60 (m, 2 H), 3,75-3,84 (m, 1 H), 4,98-4,05 (m, 1 H), 4,70 (t, *J* = 7,68 Hz, 1 H), 4,89-4,97 (m, 1 H), 5,26 (t, *J* = 10,43 Hz, 1 H), 5,2-5,75 (m, 1 H), 5,92 (s, 1 H), 7,29 (d, *J* = 5,86 Hz, 1 H), 7,50 (t, *J* = 7,50 Hz, 1 H), 7,64-7,69 (m, 1 H), 7,77 (m, 1 H), 7,95 (d, *J* = 5,86 Hz, 1 H), 8,18 (d, *J* = 8,78 Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,64 min), EM *m/z* 739 (M⁺+1).

Ejemplo 42

Preparación del Compuesto 147



Compuesto 147

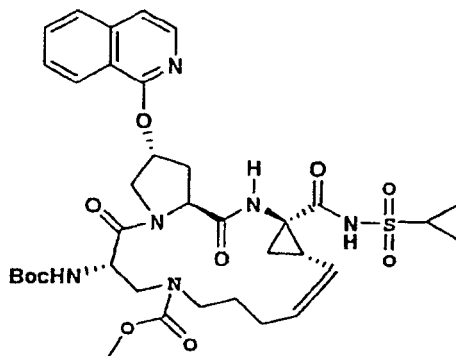
A una mezcla del compuesto 151 (100 mg, 0,144 mmol) en 5 ml de DMF se le añadieron carbonato potásico (40 mg, 0,290 mmol) y yoduro de metilo (13 μl, 0,21 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 h. Después, se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC TERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: 45% de B a 70% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 75 mg (73%) del compuesto 147 en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz, 60°C) δ 1,02-1,28 (m, 13 H),

ES 2 320 771 T3

1,64 (dd, $J = 9,70, 5,67$ Hz, 1 H), 1,72-1,81 (m, 2 H), 1,91-2,10 (m, 1 H), 2,13-2,30 (m, 1 H), 2,36-2,50 (m, 2 H), 2,54-2,68 (m, 1 H), 2,76-2,99 (m, 2 H), 3,05 (s, 3 H), 3,11-3,46 (m, 4 H), 3,79-3,96 (m, 1 H), 4,17 (m, 1 H), 4,76 (m, 2 H), 5,31 (t, $J = 10,06$ Hz, 1 H), 5,71 (m, 1 H), 5,99 (s, 1 H), 7,33 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 7,55 (t, $J = 7,50$ Hz, 1 H), 7,70 (t, $J = 7,68$ Hz, 1 H), 7,81 (m, 1 H), 7,96 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 8,17 (d, $J = 8,42$ Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 1,98 min), EM m/z 711 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 43

Preparación del Compuesto 148

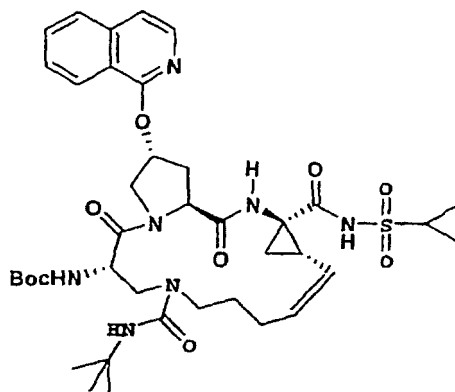


Compuesto 148

A una mezcla del compuesto 151 (20 mg, 0,029 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron diisopropilamina (15 ml, 0,086 mmol) y cloroformiato de metilo (8 mg, 0,085 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 h y después se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC TERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: 50% de B a 90% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 15 mg (69%) del compuesto 148 en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,09 (s, 9 H), 1,07-1,45 (m, 13 H), 1,56-1,61 (m, 1 H), 1,70-1,76 (m, 3 H), 2,95-2,10 (m, 1 H), 2,13-2,26 (m, 1 H), 2,33-2,55 (m, 2 H), 2,71-2,78 (m, 1 H), 2,93-3,02 (m, 1 H), 3,33 (m, 2 H), 3,48-3,57 (m, 2 H), 3,75 (s, 3 H), 4,04-4,12 (m, 1 H), 4,64 (t, $J = 8,42$ Hz, 1 H), 4,90 (m, 2 H), 5,19 (t, $J = 10,25$ Hz, 1 H), 5,69-5,77 (m, 1 H), 5,93 (s, 1 H), 7,34 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 7,55 (t, $J = 6,95$ Hz, 1 H), 7,72 (t, $J = 7,32$ Hz, 1 H), 7,83 (d, $J = 7,32$ Hz, 1 H), 7,98 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 8,20 (d, $J = 8,42$ Hz, 1 H), 9,21 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,75 min), EM m/z 755 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 44

Preparación del Compuesto 150



Compuesto 150

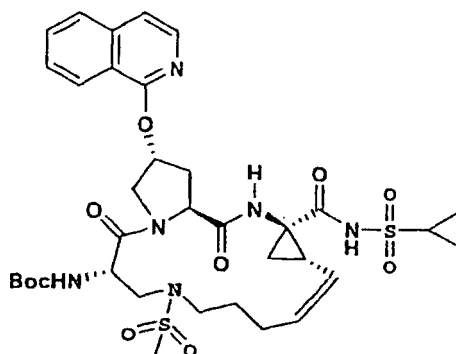
A una mezcla del compuesto 151 (20 mg, 0,029 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron diisopropilamina (15 ml, 0,086 mmol) e isocianato de terc-butilo (8 ml, 0,058 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 h y después se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC XTERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 55% de B a 90% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 15 mg (65%) del compuesto 150 en forma de un sólido de color blanco (15 mg, 65%). ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,06-1,34 (m, 13 H), 1,21 (s, 9 H), 1,40 (s, 9 H), 1,58-1,75 (m, 3 H), 1,97-2,09 (m, 1 H), 2,11-2,23 (m, 1 H), 2,37-2,50 (m, 2 H), 2,69-2,82 (m, 1 H), 2,94-3,04 (m, 1 H), 3,22 (m, 1 H), 3,36-3,46 (m, 2 H), 4,12 (d, $J = 12,44$ Hz, 1 H), 4,39 (d, $J = 11,34$ Hz, 1 H), 4,50-4,57 (m, 1 H), 4,69 (t, $J = 8,23$ Hz, 1 H), 5,20-5,27 (m, 1 H), 5,69-5,78 (m, 1 H), 5,90 (s, 1 H), 7,34 (d, $J =$

ES 2 320 771 T3

5,86 Hz, 1 H), 7,57 (t, $J = 7,14$ Hz, 1 H), 7,73 (m, 1 H), 7,83 (m, 1 H), 7,98 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 8,24 (d, $J = 8,05$ Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 3,04 min), EM m/z 796 ($M^+ + 1$).

Ejemplo 45

Preparación del Compuesto 153

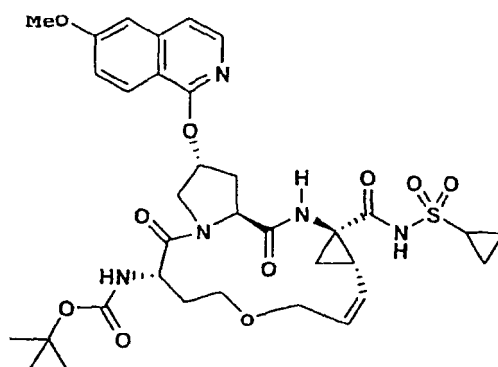


Compuesto 153

A una mezcla del compuesto 151 (20 mg, 0,029 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron diisopropilamina (15 ml, 0,086 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (5 μ l 0,065 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 h, y después se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC TERRA, S5, 30 x 50 mm, gradiente: de 50% de B a 90% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 17 mg (76%) del compuesto 153 en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1,02-1,49(m, 13 H), 1,59 (m, 1 H), 1,72-1,86 (m, 3 H), 1,96-2,09 (m, 1 H), 2,37-2,50 (m, 2 H), 2,63-2,80 (m, 2 H), 2,91-3,08 (m, 5 H), 2,97 (s, 3 H), 3,22-3,45 (m, 3 H), 4,19 (dd, $J = 11,89$, 3,48 Hz, 1 H), 4,52 (d, $J = 11,71$ Hz, 1 H), 4,62 (dd, $J = 9,88$, 7,32 Hz, 1 H), 4,83-4,96 (m, 1 H), 5,17 (t, $J = 10,06$ Hz, 1 H), 5,75 (m, 1 H), 5,94 (s, 1 H), 7,33 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H), 7,57 (d, $J = 8,05$ Hz, 1 H), 7,72 (t, $J = 7,50$ Hz, 1 H), 7,82 (m, 1 H), 7,99 (d, $J = 6,22$ Hz, 1 H), 8,20 (d, $J = 8,42$ Hz, 1 H). CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 2,59 min), EM m/z 775 ($M^+ + 1$).

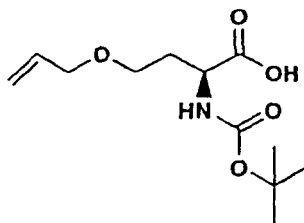
Ejemplo 46

Preparación del Compuesto 141: éster terc-butílico del ácido [(Z)-(1S,4R,13S,17R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-17-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,14-dioxo-10-oxa-3,15-diaza-triciclo[13,3,0,0^{4,5}]octadec-7-en-13-il]-carbámico



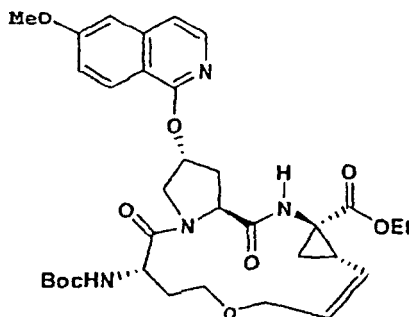
compuesto 141

Etapa 46a

Preparación de ácido (S)-4-aliloxi-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)butírico

A una mezcla de hidruro sódico (913 mg, 22,8 mmol) en DMF a 0°C se le añadió N-t-Boc-L-homoserina (2 g, 9,13 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 min y después se añadió bromuro de alilo (1,38 g, 11,4 mmol). La mezcla se calentó a ta y se agitó durante 2 h. Después, se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua y se lavó secuencialmente con hexano y éter. Las fases orgánicas se desecharon y la fase acuosa se ajustó cuidadosamente a pH 3 con HCl 1 N. Esta solución acuosa ácida se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para producir 2,2 g (93%) de ácido (S)-4-aliloxi-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)butírico en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 1,42 (s, 9 H), 1,80-1,90 (m, 1 H), 2,04-2,16 (m, 1 H), 3,50-3,54 (m, 2 H), 3,97 (d, *J* = 4,39 Hz, 2 H), 4,23 (dd, *J* = 8,78, 4,39 Hz, 1 H), 5,15 (d, *J* = 10,25 Hz, 1 H), 5,26 (dd, *J* = 17,38, 1,65 Hz, 1 H), 5,84-5,97 (m, 1 H). Este material de partida se empleó en la síntesis de 1-((3R,5S)-1-((S)-4-(aliloxi)-2-(*tert*-butoxicarbonil)butanoil)-3-(6-metoxiisoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-5-carboxamido)-2-vinilciclopropano-carboxilato de (1R,2S)-etilo como se ha descrito en el ejemplo 2.

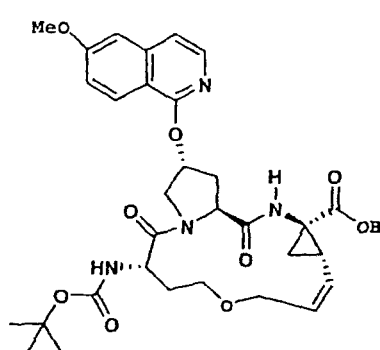
Etapa 46b

Preparación de éster etílico del ácido (Z)-((1S,4R,13S,7R)-13-*tert*-butoxicarbonilamino-17-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,14-di-oxo-10-oxa-3,15-diaza-triciclo[13,3,0,0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carboxílico

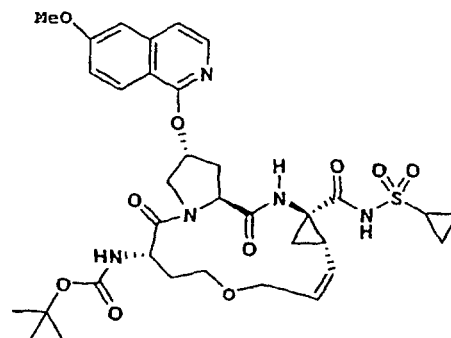
A una solución de 1-((3R,5S)-1-((S)-4-(aliloxi)-2-(*tert*-butoxicarbonil)butanoil)-3-(6-metoxiisoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-5-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo (220 mg, 0,33 mmol) en 84 ml de cloruro de metileno se le añadió dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-trimetil-fenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilideno][bencilideno]-rutenio (IV) (27 mg, 0,032 mmol). La solución homogénea de color naranja claro se calentó a reflujo durante 3 h para dar una solución de color naranja oscuro. En este momento, se añadió otra porción del catalizador de rutenio (13 mg, 0,016 mmol) y el calentamiento a reflujo se continuó durante 2 h más. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se concentró al vacío para dar un aceite de color naranja. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo y después MeOH al 10% en acetato de etilo) dio 174 mg (80%) de éster etílico del ácido (Z)-((1S,4R,13S,17R)-13-*tert*-butoxicarbonilamino-17-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,14-dioxo-10-oxa-3,15-diaza-triciclo[13,3,0,0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,74 min), EM *m/z* 639 (M⁺+1).

Etapa 46c

Preparación de los Compuestos 140 y 141



Compuesto 140

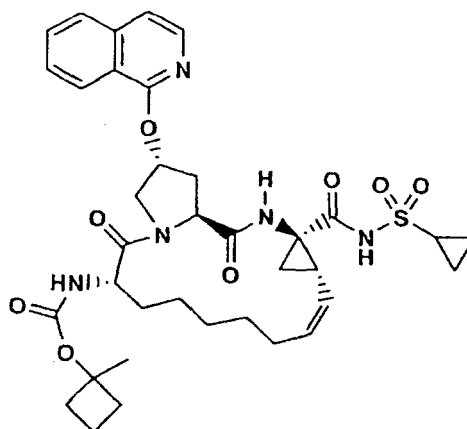


Compuesto 141

Se hidrolizó éster etílico del ácido (Z)-(1S,4R,13S,17R)-13-*tert*-butoxicarbonilamino-17-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,14-dioxo-10-oxa-3,15-diaza-triciclo[13,3,0,0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carboxílico de acuerdo con Ejemplo 2 (etapa 2E) para dar el Compuesto 140. El Compuesto 140 se convirtió en el Compuesto 141, éster *tert*-butílico del ácido [(Z)-(1S,4R,13S,17R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-17-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-2,14-dioxo-10-oxa-3,15-diaza-triciclo[13,3,0,0^{4,6}]octadec-7-en-13-il]-carbámico, de acuerdo con el Ejemplo 7, CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,51 min), EM *m/z* 714(M⁺+1).

Ejemplo 47

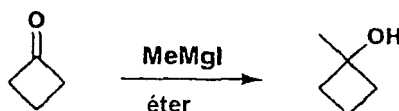
Procedimiento general para preparar P4-carbamatos a partir de alcoholes terciarios. Preparación del Compuesto 56: 1-metil-ciclobutil éster del ácido [(Z)-(1S,4R,14S,18R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



Compuesto 56

Etapa 47a

Preparación de 1-metilciclobutanol



ES 2 320 771 T3

A una solución de 6 ml de yoduro de metilmagnesio (3 M en éter) a -10°C se le añadió gota a gota ciclobutanona (1 g, 14,3 mmol). La mezcla se agitó durante 2,5 h (de -10°C a ta). A la mezcla de reacción se le añadió HCl diluido hasta que se disolvió todo el precipitado. La mezcla de reacción homogénea se extrajo con éter (2 x). Los extractos de éter combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para dar 0,9 g (73%) de 1-metilciclobutanol en forma de un aceite de color amarillo.

Etapa 47b

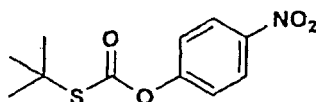
Preparación de 1-metil-ciclobutil éster del ácido [(Z)-(1S,4R,14S,18R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico

A una suspensión de KH (400 mg, al 35% en aceite, 3,5 mmol) se le añadieron 5 ml de hexano. Se agitó durante 5 min y después el hexano se retiró. Este proceso se repitió tres veces. Se añadió THF (5 ml) a este KH prelavado y después se añadió 1-metilciclobutanol (200 mg, 2,3 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó (de 0°C a ta) durante 1 h y después se añadió dipiridin-2-il éster del ácido carbónico (753 mg, 3,5 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 4 h y la reacción se diluyó con NH₄Cl ac. sat. Después, la mezcla se extrajo con EtOAc y el disolvente se retiró al vacío para obtener 200 mg del piridin-2-il éster de 1-metil-ciclobutil éster del ácido carbónico en bruto en forma de un sólido de color naranja. Se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una suspensión de 50 mg (0,073 mmol) del compuesto 11, sal bis clorhidrato de (1-ciclopropanosulfonilamino-carbonil-2-vinil-ciclopropil)-amida del ácido [1-(2-Amino-3,3-dimetil-butiril)-4-(6-metoxi-isoquinolin-1-iloxi)-pirrolidina-2-carboxílico] en CH₂Cl₂ se le añadieron diisopropiletilamina (29 mg, 0,22 mmol) y 70 mg (0,33 mmol) del reactivo anterior (piridin-2-il éster de 1-metil-ciclobutil éster del ácido carbónico). Esta mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche y después se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 32 mg (62%) del compuesto 56 en forma de un sólido de color blanco. Condición de HPLC preparativa: YMC XTERRA, S5, 19 x 100 mm, gradiente: de 50% de B a 90% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min. CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,47 min), EM *m/z* 708 (M⁺+1).

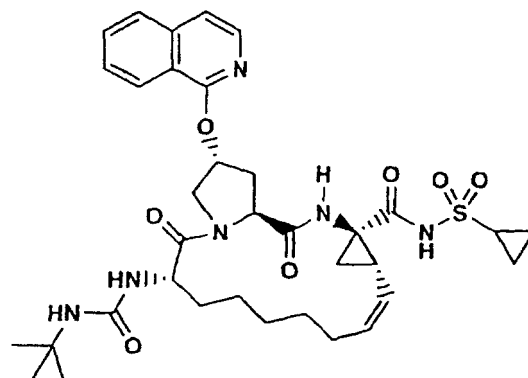
El Compuesto 59 se preparó por el procedimiento general usado para el Compuesto 56 (ejemplo 47): se convirtió 1-metilciclopropanol en el reactivo piridin-2-il éster de 1-metil-ciclopropil éster del ácido carbónico que se preparó de acuerdo con el procedimiento anterior (ejemplo 47). Se preparó 1-metil-1-ciclopropanol mediante una ligera modificación del procedimiento descrito por Kulinkovich, O.G.; Sviridov, S.V.; y Vasilevski, D.A. Synthesis, 1991, 234: A una solución agitada de acetato de metilo (1,85 g, 25 mmol) y Ti(OPr-*i*)₄ (744 µl, 2,5 mmol) en éter dietílico (80 ml) se le añade lentamente bromuro de etilmagnesio (solución 3 M en éter dietílico) (18 ml, 53 mmol) en éter dietílico (60 ml) durante un periodo de 1 h mientras se mantiene la temperatura de reacción a 18-20°C. Cuando se completa la adición, la agitación se continúa durante 10 min. La mezcla se vierte en H₂SO₄ ac. al 10% enfriado (5°C) (250 ml) y el producto se extrae con éter dietílico (3 x 50 ml). Los extractos de éter combinados se lavan con agua (50 ml), se secan (MgSO₄) y se concentran cuidadosamente por evaporación rotatoria (~2666,44 Pa, ta) para dar 1,7 g de 1-metil-1-ciclopropanol (pureza de ~80%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0,42-0,45 (m, 2H), 0,73-0,77 (m, 2 H), 1,44 (s, 3 H), 1,64 (s a, 1 H).

Los siguientes compuestos también se prepararon usando el procedimiento general anterior: el compuesto 50 se preparó a partir de 1-metilciclopentanol; los compuestos 39 y 51 se prepararon a partir de 1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-ol, el compuesto 55 se preparó a partir de 1,1-difluoro-2-metilpropan-2-ol (1,1-difluoro-2-metilpropan-2-ol se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por Dickey, J. B. y Towne, E. B. US2700686), los compuestos 40 y 52 se prepararon a partir de 1-cloro-2-metilpropan-2-ol, el compuesto 124 se preparó a partir de 1,1,1-tricloro-2-metilpropan-2-ol, el compuesto 123 se preparó a partir de 3-hidroxi-3-metilbutan-2-ona, y el compuesto 139 se preparó a partir de O-4-nitrofenil carbonotioato de S-terc-butilo (véase a continuación) (Este reactivo se preparó como se describe por E.M. Gordon, J.C. Barrish, G.S. Bisacchi, C-Q. Sun, J.A. Tino, G.D. Vite, y R. Zahler en el documento US005559256A.).



Ejemplo 48

Preparación del Compuesto 126



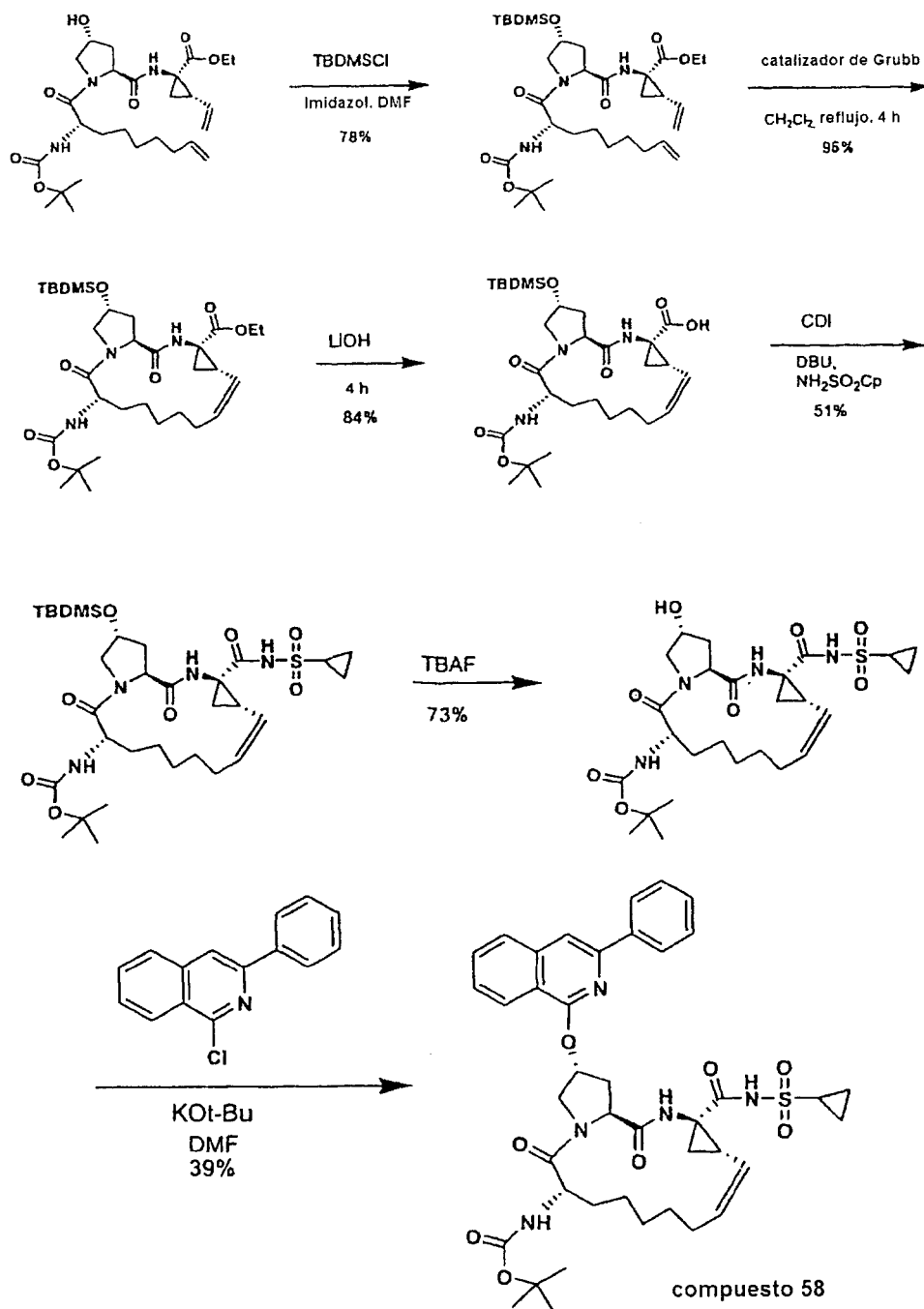
compuesto 126

A una mezcla del compuesto 11 {bis clorhidrato d [14-amino-18-(isoquinolin-1-iloxi)-2,15-dioxo-3,16-diaza-tri-ciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida del ácido ciclopropanosulfónico} (20 mg, 0,029 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron 18 μ l (0,10 mmol) de DIPEA y 4 mg (0,04 mmol) de isocianato de t-butilo. La mezcla se agitó a ta durante una noche. Después, se diluyó con EtOAc y se lavó con tampón a pH 4 (2 x) y salmuera (1 x). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. El aceite resultante se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa (YMC XTERRA, S5, 19 x 100 mm, gradiente: de 50% de B a 100% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para aislar el compuesto 126 en forma de un polvo de color blanco (17 mg, 82%): CL-EM (Procedimiento D, tiempo de retención: 3,24 min), EM m/z 695 ($M^+ + 1$). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0,86-0,96 (m, 2 H), 1,12 (s, 9 H), 1,01-1,49 (m, 18 H), 1,52-1,66 (m, 1 H), 1,70-1,78 (m, 1 H), 1,83-1,95 (m, 2 H), 2,14-2,25 (m, 1 H), 2,49 (s a, 1 H), 2,71 (m, 2 H), 2,86-2,92 (m, 1 H), 4,07 (dd, J = 11,71, 4,03 Hz, 1 H), 4,40-4,44 (m, 1 H), 4,62-4,69 (m, 2 H), 4,94-5,00 (m, 1 H), 5,65-5,74 (m, 1 H), 5,97 (s a, 1 H), 7,03 (s, 1 H), 7,32 (d, J = 6,22 Hz, 1 H), 7,50-7,52 (m, 1 H), 7,68-7,78 (m, 2 H), 8,00 (d, J = 5,86 Hz, 1 H), 8,22 (d, J = 7,68 Hz, 1 H), 10,15 (s, 1 H).

(Esquema pasa a página siguiente)

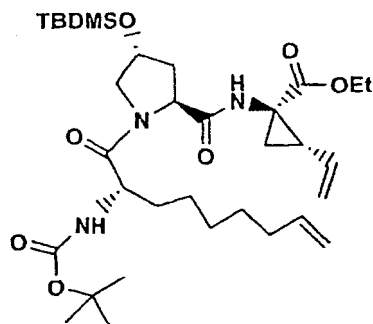
Ejemplo 49

Preparación del Compuesto 58



Etapa 49a

Preparación de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(*tert*-butil-dimetilsilani-
loxi)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico

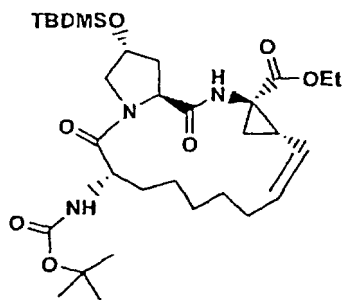


A una mezcla de éster etílico del ácido 1-[[1-(2(*S*)-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4(*R*)-hidroxi-pirrolidina-2(*S*)-carbonil]-(1*R*)-amino]-2(*S*)-vinil-ciclopropanocarboxílico (1,5 g, 2,87 mmol) en 10 ml de DMF se le añadieron imidazol (0,25 g, 3,67 mmol) y cloruro de *tert*-butil-dimetilsililo (516 mg, 3,44 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. Después, la mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para obtener un sólido en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 20% en hexano) dio 1,43 g (78%) de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico en forma de un sólido de color blanco.

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 0,10 (s, 6 H), 0,89 (s, 9 H), 1,22 (m, 3 H), 1,31-1,48 (m, 16 H), 1,50-1,75 (m, 3 H), 2,06 (m, 3 H), 2,11-2,33 (m, 2 H), 3,70 (m, 2 H), 4,03-4,19 (m, 2 H), 4,21 (m, 1 H), 4,45 (t, $J = 7,87$ Hz, 1 H), 4,59 (m, 1 H), 4,91 (d, $J = 9,15$ Hz, 1 H), 4,98 (d, $J = 17,20$ Hz, 1 H), 5,08 (dd, $J = 10,25, 1,83$ Hz, 1 H), 5,27 (dd, $J = 17,38, 1,65$ Hz, 1 H), 5,65-5,87 (m, 2 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 4,00 min), EM m/z 636 ($\text{M}^+ + 1$).

Etapa 49b

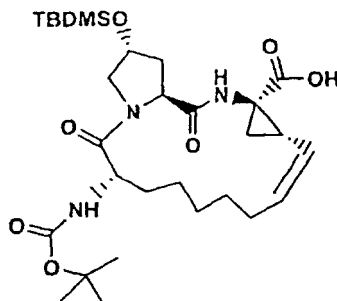
Preparación de éster etílico del ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(*tert*-butildimetil-silaniloxy)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



A una solución de éster etílico del ácido 1-[[1-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-non-8-enoil)-4-(*tert*-butildimetil-silaniloxy)-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinilciclopropanocarboxílico (1,63 g, 2,56 mmol) en 640 ml de cloruro de metileno se le añadieron 215 mg (0,26 mmol) de dicloruro de triciclohexilfosfina[1,3-bis(2,4,6-tri[bencilideno]rutenio (IV). La mezcla se calentó a reflujo durante 15 min. El residuo se concentró al vacío y después se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 30%/hexano. Para decolorar adicionalmente la muestra, el producto en bruto se cromatografió una segunda vez eluyendo con éter al 50% en hexano para dar 1,5 g (96%) de éster etílico del ácido 14-*tert*-butoxicarbonilamino-18-(*tert*-butildimetil-silaniloxy)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (500 MHz, CD_3Cl) δ 0,06 (s, 3 H), 0,07 (s, 3 H), 0,86 (s, 9 H), 1,18-1,24 (m, 6 H), 1,34-1,64 (m, 14 H), 1,86-1,96 (m, 3 H), 2,02-2,09 (m, 1 H), 2,11-2,17 (m, 1 H), 2,19-2,28 (m, 1 H), 2,57-2,63 (m, 1 H), 3,50-3,54 (m, 1 H), 3,71 (dd, $J = 10,22, 6,26$ Hz, 1 H), 4,06-4,17 (m, 2 H), 4,52-4,58 (m, 2 H), 4,75 (d, $J = 8,55$ Hz, 1 H), 5,21 (t, $J = 9,92$ Hz, 1 H), 5,35 (d, $J = 7,63$ Hz, 1 H), 5,45-5,50 (m, 1 H), 6,94 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,88 min), EM m/z 608 ($\text{M}^+ + 1$).

Etapa 49c

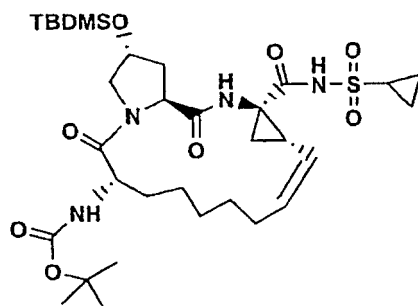
Preparación de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetilsilanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico



A una solución de éster etílico del ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetilsilanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (1,5 g, 2,47 mmol) en un sistema disolvente mixto de THF (4 ml), metanol (1 ml) y agua (2 ml) se le añadió hidróxido de litio monohidrato en polvo (1,0 g, 50 mmol). La suspensión de color amarillo claro se agitó a ta en una atmósfera de N₂ durante 4 h. Después, la mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre éter y agua. La fase de éter se desechó y la fase acuosa se trató con HCl 1 N hasta alcanzar pH 4. Esta solución ácida se extrajo con EtOAc (3 x). Los extractos de EtOAc combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío para dar 1,2 g (84%) de ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetilsilanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) 0,12 (s, 6 H), 0,89 (s, 9 H), 1,23-1,64 (m, 17 H), 1,70-1,87 (m, 1 H), 1,90-2,49 (m, 6 H), 3,70-3,80 (m, 1 H), 3,83-3,90 (m, 1 H), 4,28-4,36 (m, 1 H), 4,47-4,55 (m, 1 H), 4,65 (s, 1 H), 5,30-5,39 (m, 1 H), 5,53-5,62 (m, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,69 min), EM *m/z* 580 (M⁺+1).

Etapa 49d

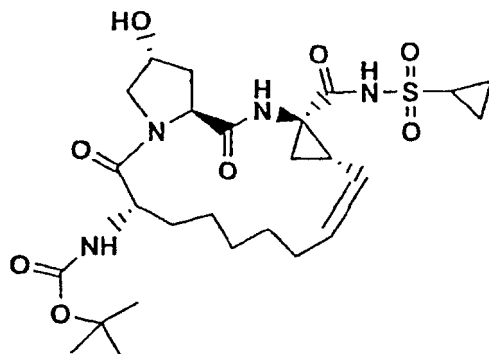
Preparación de éster terc-butílico del ácido [18-(terc-butildimetilsilanilo)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-yl]-carbámico



Se disolvió ácido 14-terc-butoxicarbonilamino-18-(terc-butildimetilsilanilo)-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico (500 mg, 0,86 mmol) en 25 ml de THF y se trató con CDI (180 mg, 1,12 mmol). (Debe tenerse cuidado para evitar la humedad usando cristalería secada al horno y manteniendo una atmósfera de N₂ seca). Después de calentar a reflujo la mezcla de reacción durante 2 h, se enfrió a ta y se trató secuencialmente con ciclopropilsulfonamida (135 mg, 1,12 mmol) y DBU (170 mg, 1,12 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a ta, y el THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y tampón a pH 4. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. Después, se purificó por cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 33% en hexano) para dar 300 mg (51%) de éster terc-butílico del ácido [18-(terc-butildimetilsilanilo)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-yl]-carbámico en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 1H 0,07 (s, 3 H), 0,08 (s, 3 H), 0,85 (s, 9 H), 0,87-1,49 (m, 21 H), 1,73-1,95 (m, 3 H), 2,08-2,16 (m, 1 H), 2,25-2,36 (m, 2 H), 2,42-2,56 (m, 1 H), 2,85-2,93 (m, 1 H), 3,65-3,74 (dd, *J* = 10,61, 3,66 Hz, 1 H), 3,89 (d, *J* = 10,25 Hz, 1 H), 4,34 (m, *J* = 9,70, 9,70 Hz, 1 H), 4,43 (t, *J* = 7,87 Hz, 1 H), 4,57 (s, 1 H), 4,94-5,01 (m, 1 H), 5,10 (d, *J* = 8,78 Hz, 1 H), 5,66-5,75 (m, 1 H), 6,55 (s, 1 H), 10,13 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,81 min), EM *m/z* 683 (M⁺+1).

Etapa 49e

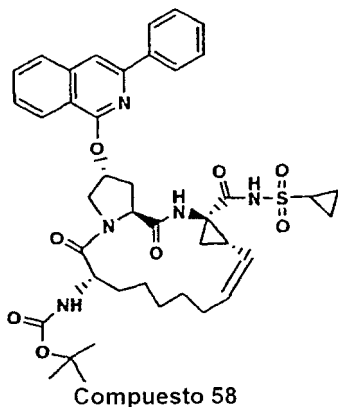
Éster terc-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico



A una mezcla de éster terc-butílico del ácido [18-(terc-butil-dimetilsilanilo)-4-ciclopropanosulfonil-aminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico (330 mg, 0,48 mmol) en 25 ml de THF se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (150 mg, 0,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 18 h y después el THF se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para dar el producto en bruto. Después, se purificó por trituración con hexano para producir 200 mg (73%) de éster terc-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl) δ 1,87-1,64 (m, 21 H), 1,70-1,98 (m, 3 H), 2,15-2,56 (m, 5 H), 2,85-2,94 (m, 1 H), 3,71 (d, J = 13,91 Hz, 1 H), 4,10-4,26 (m, 2 H), 4,51 (t, J = 7,87 Hz, 1 H), 4,62 (s, 1 H), 4,98 (m, 1 H), 5,06 (d, J = 8,78 Hz, 1 H), 5,64-5,71 (m, 1 H), 6,72 (s, 1 H), 10,24 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 2,85 min), EM m/z 569 (M⁺+1).

Etapa 49f

Preparación del Compuesto 58: éster terc-butílico del ácido [(Z)-(1S,4R,14S,18R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-(3-fenil-isoquinolin-1-ilo)-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico



A una mezcla de éster terc-butílico del ácido (4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-18-hidroxi-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il)-carbámico (20 mg, 0,035 mmol) en 1 ml de DMF se le añadió t-butoxido potásico (22 mg, 0,196 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 5 min y después se añadió 1-cloro-3-fenilisoquinolina (15 mg, 0,062 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 15 h y después se concentró al vacío. Este producto en bruto se trituró con éter. El residuo se disolvió en MeOH y después se purificó por HPLC preparativa. (YMC XTERRA, S5, 19 x 100 mm, gradiente: de 60% de B a 100% de B, 15 min, mantenido 2 min, caudal 25 ml/min) para dar 10 mg (39%) del compuesto 58, éster terc-butílico del ácido [(Z)-(1S,4R,14S,18R)-4-ciclopropanosulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-(3-fenil-isoquinolin-1-ilo)-3,16-di-aza-triciclo[14,3,0,0^{4,6}]nonadec-7-en-14-il]-carbámico, en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (500 MHz, CD₃Cl) δ 0,90-1,64 (m, 21 H), 1,76-1,97 (m, 3 H), 2,26-2,31 (m, 1 H), 2,52-2,63 (s a, 1 H), 2,69-2,81 (m, 2 H), 2,88-2,93 (m, 1 H), 4,11 (d, J = 11,60 Hz, 1 H), 4,33 (m, 1 H), 4,61 (d, J = 7,94 Hz, 2 H), 4,99 (t, J = 9,31 Hz, 1 H), 5,05 (d, J = 7,93 Hz, 1 H), 5,69-5,74 (m, 1 H), 6,08 (s, 1 H), 6,60 (s, 1 H), 7,38-7,47 (m, 2 H), 7,50 (t, J = 7,63 Hz, 2 H), 7,63 (t, J = 7,32 Hz, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 7,77 (d, J = 8,24 Hz, 1 H), 8,10 (d, J = 7,32 Hz, 2 H), 8,18 (d, J = 7,93 Hz, 1 H), 10,27 (s, 1 H). CL-EM (Procedimiento A, tiempo de retención: 3,72 min), EM m/z 772 (M⁺+1).

ES 2 320 771 T3

Los compuestos de las tablas 2 y 3 se prepararon empleando los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores:

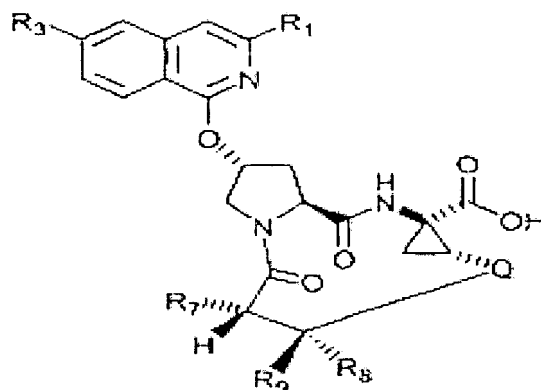
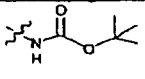
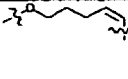
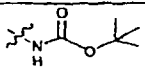
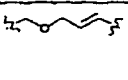
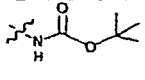
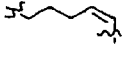
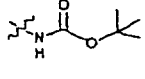
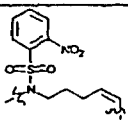
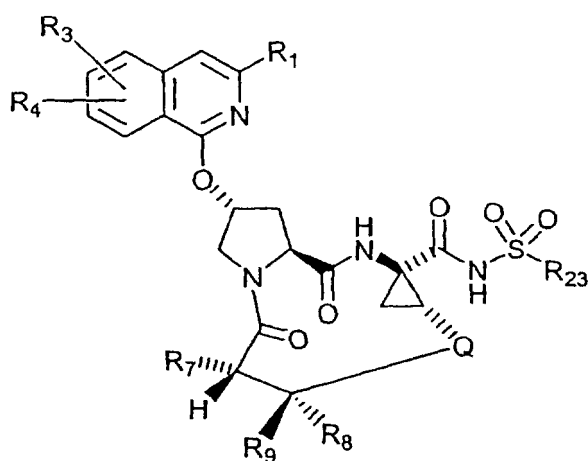


TABLA 2

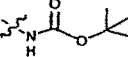
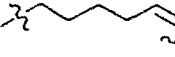
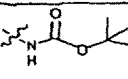
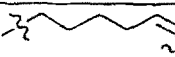
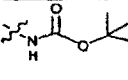
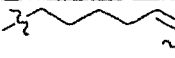
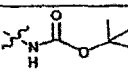
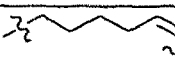
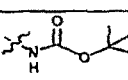
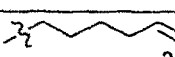
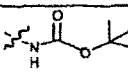
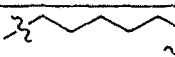
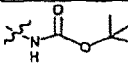
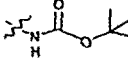
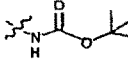
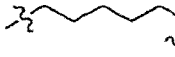
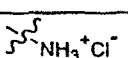
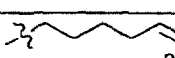
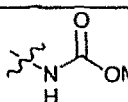
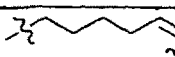
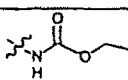
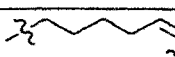
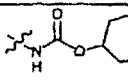
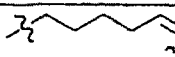
Comp.	R ₁	R ₃	R ₇	R ₈	R ₉	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
1	-CH ₃	-CH ₃		-CH ₃	-CH ₃		593
17A	-CH ₃	-OMe		-CH ₃	-CH ₃		623
18A	-CH ₃	-OMe		-CH ₃	-CH ₃		641
27	-CH ₃	-OMe		-CH ₃	-CH ₃		625
61	-CH ₃	-OMe		-Me	-CH ₃		639
79	-CH ₃	-OMe		-Me	-Me		669

Comp	R ₁	R ₃	R ₇	R ₈	R ₉	Q	Espec. de + (M+H)
84							625
140							611
143							609
144							779



ES 2 320 771 T3

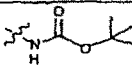
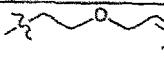
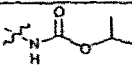
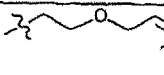
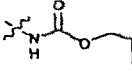
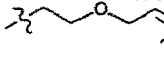
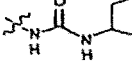
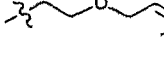
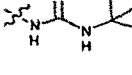
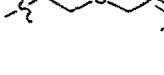
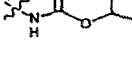
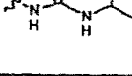
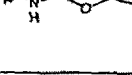
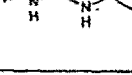
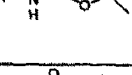
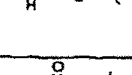
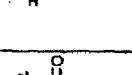
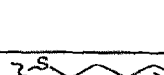
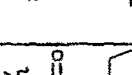
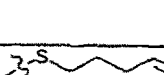
TABLA 3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
2			H, H					670
3			H, H					698
4			H, H					696
5			H, H					786
6			H, H					738
7			H, H					740
8			H, H					710
9			H, H					710
10			H, H					698
11			H, H					596
12			H, H					654
13			H, H					710
14			H, H					724

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
15			H, H					710
16			H, H					682
17B			6-OMe, H					726
18 B			6-OMe, H					744
19			6-OMe, H					776
20			H, H					708
21			H, H					706
22			H, H					678
23			H, H					681
24			H, H					668
25			H, H					674
26			H, H					638
28			6-OMe, H					728
29			6-OMe, H					742

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
30			6-OMe, H					756
31			6-OMe, H					714
32			6-OMe, H					742
33			6-OMe, H					739
34			6-OMe, H					727
35			6-OMe, H					728
36			6-OMe, H					753
37			6-OMe, H					742
38			6-OMe, H					767
39			6-OMe, H					782
40			6-OMe, H					762, 764
41			6-OMe, H					744
42			6-OMe, H					772
43			6-OMe, H					769

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₁	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₁	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
44			6-OMe, H					758
45			6-OMe, H					786
46			6-OMe, H					783
47			6-OMe, H					788
48			6-OMe, H					804
49			6-OMe, H					790
50			H, H					722
51			H, H					750
52			H, H					730
53			6-OMe, H					740
54			6-OMe, H					754
55			H, H					732
56			H, H					708

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₁₁	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
57			H, H					730
58			H, H					772
59			H, H					694
60			6-OMe, H					723
62			6-OMe, H					742
63			6-OMe, H					756
64			6-OMe, H					728
65			6-OMe, H					753
66			6-OMe, H					756
67			6-OMe, H					770
68			6-OMe, H					742
69			6-OMe, H					767
70			6-OMe, H					770
71			6-OMe, H					784

Comp.	R ₁₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
72			6-OMe, H					756
73			6-OMe, H					781
74			6-OMe, H					730
75			6-OMe, H					758
76			6-OMe, 7-Cl					778,780
77			5-OMe, H					774
78			5-Cl, H					748,750
80			6-OMe, H					772
81			6-OMe, H					771
82			6-OMe, H					783
83			6-OMe, H					672
85			6-OMe, H					728
86			6-OMe, H					727
87			6-OMe, H					739

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
88			6-OMe, H					742
89			6-OMe, H					714
90			6-OMe, H					740
91			6-OMe, H					804
92			6-OMe, H					803
93			6-OMe, H					801
94			6-OMe, H					816
95			6-OMe, H					818
96			6-OMe, H					790
97			6-OMe, H					804
98			6-OMe, H					790
99			6-OMe, H					816
100			6-OMe, H					801
101			6-OMe, H					815

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
102			6-OMe, H					803
103			6-OMe, H					818
104			6-OMe, H					803
105			6-OMe, H					848
106			6-OMe, H					816
107			6-OMe, H					847
108			6-OMe, H					846
109			6-OMe, H					833
110			6-OMe, H					859

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Mass Spec. (M+H) ⁺
111			6-OMe, H					844
112			6-OMe, H					847
113			6-OMe, H					833
114			6-OMe, H					861
115			6-OMe, H					758
116			H, H					724
117			6-OMe, H					644
118			H, H					684
119			H, H					624
120			H, H					664

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₅	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
121			6-OMe, H					772
122			H, H					708
123			H, H					724
124			H, H					798, 800
125			H, H					710
126			H, H					695
127			H, H					707
128			H, H					681
129			H, H					751
130			5-Cl, H					730
131			6-OMe, 7-Cl					760
132			5-F, 6-OMe					744
133			5-OMe, H					726
134			5,6-di- methox y					756

ES 2 320 771 T3

Comp.	R _D	R _I	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
135			6-OMe, H					725
136			6-OMe, H					737
137			6-OMe, H					802
138			H, H					772
139			H, H					742
141			6-OMe, H					714
142			6-OMe, H					845
145			H, H					882
146			H, H					739
147			H, H					711
148			H, H					755

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₈	R ₉	R ₇	Q	Espec. de Masas (M+H) ⁺
149			H, H					811
150			H, H					796
151			H, H					697
152			H, H					765
153			H, H					775

Los compuestos de las tablas 4 y 5 pueden prepararse empleando los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores:

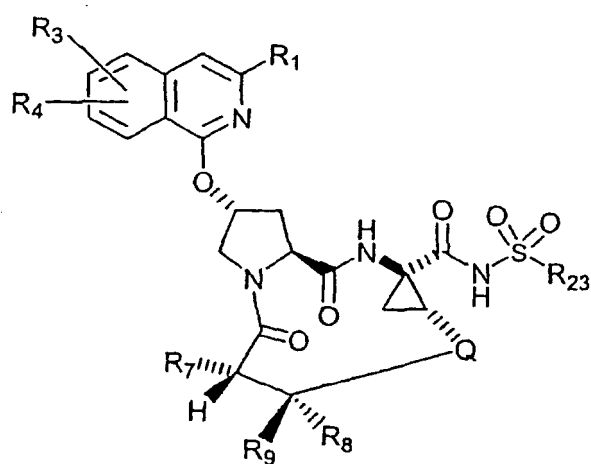


TABLA 4

Comp.	R ₁₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
201			6-OMe, H				
202			6-OMe, H				
203			6-OMe, H				
204			6-OMe, H				
205			H, H				
206			H, H				
207			6-OMe, H				
208			6-OMe, H				
209			6-OMe, H				
210			6-OMe, H				
211			6-OMe, H				
212			H, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₈	R ₉	R ₇	Q
213			6-OMe, H				
214			6-OMe, H				
215			6-OMe, H				
216			6-OMe, H				
217			6-OMe, H				
218			H, H				
219			6-OMe, H				
220			6-OMe, H				
221			6-OMe, H				
222			6-OMe, H				
223			6-OMe, H				
224			6-OMe, H				
225			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Q
226			6-OMe, H				
227			6-OMe, H				
228			6-OMe, H				
229			H, H				
230			6-OMe, H				
231			6-OMe, H				
232			6-OMe, H				
233			6-OMe, H				
234			6-OMe, H				
235			H, H				
236			6-OMe, H				
237			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
238			6-OMe, H				
239			6-OMe, H				
240			H, H				
241			6-OMe, H				
242			6-OMe, H				
243			6-OMe, H				
244			6-OMe, H				
245			6-OMe, H				
246			6-OMe, H				
247			6-OMe, H				
248			6-OMe, H				
249			H, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₁	R ₉	R ₇	Q
250			H, H				
251			6-OMe, H				
252			6-OMe, H				
253			6-OMe, H				
254			6-OMe, H				
255			6-OMe, H				
256			H, H				
257			6-OMe, H				
258			6-OMe, H				
259			6-OMe, H				
260			6-OMe, H				
261			6-OMe, H				
262			H, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
263			6-OMe, H				
264			6-OMe, H				
265			6-OMe, H				
266			6-OMe, H				
267			H, H				
268			6-OMe, H				
269			6-OMe, H				
270			6-OMe, H				
271			6-OMe, H				
272			6-OMe, H				
273			H, H				
274			6-OMe, H				
275			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
276			6-OMe, H				
277			6-OMe, H				
278			6-OMe, H				
279			H, H				
280			6-OMe, H				
281			6-OMe, H				
282			6-OMe, H				
283			6-OMe, H				
284			6-OMe, H				
285			H, H				
286			6-OMe, H				
287			6-OMe, H				
288			6-OMe, H				

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
289			6-OMe, H				
290			6-OMe, H				
291			H, H				
292			6-OMe, H				
293			6-OMe, H				
294			6-OMe, H				
295			6-OMe, H				
296			6-OMe, H				
297			6-OMe, H				
298			6-OMe, H				
299			6-OMe, H				
300			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₂	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
301			6-OMe, H				
302			6-OMe, H				
303			6-OMe, H				
304			6-OMe, H				
305			6-OMe, H				
306			6-OMe, H				
307			6-OMe, H				
308			6-OMe, H				
309			6-OMe, H				
310			6-OMe, H				
311			6-OMe, H				
312			6-OMe, H				
313			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q
314			6-OMe, H				
315			6-OMe, H				
316			6-OMe, H				
317			6-OMe, H				
318			6-OMe, H				
319			6-OMe, H				
320			6-OMe, H				
321			6-OMe, H				
322			6-OMe, H				
323			6-OMe, H				
324			6-OMe, H				
325			6-OMe, H				
326			6-OMe, H				

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₁	Q
327			6-OMe, H				
328			6-OMe, H				
329			6-OMe, H				
330			6-OMe, H				
331			6-OMe, H				

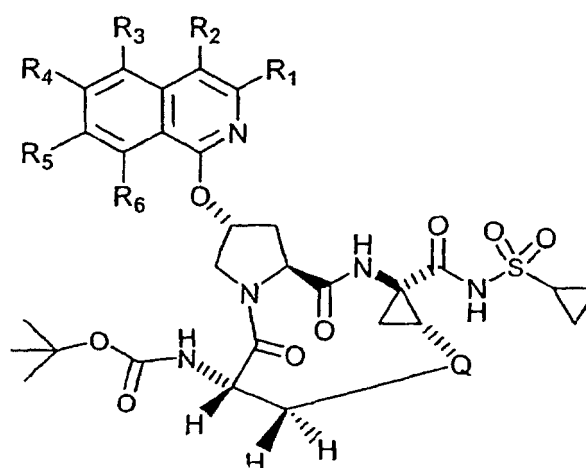
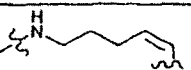
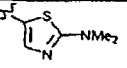
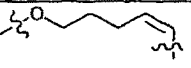
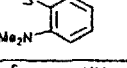
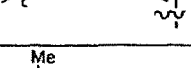
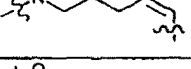
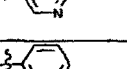
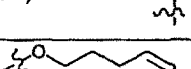
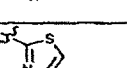
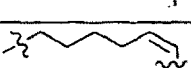
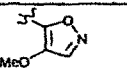
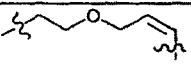
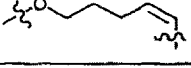
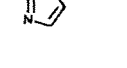
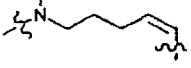
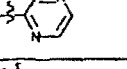
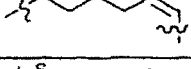
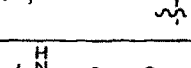
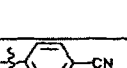
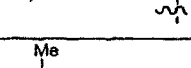
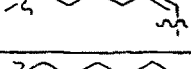
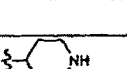
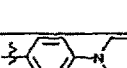
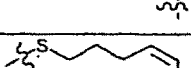
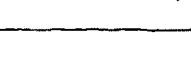


TABLE 5

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Q
401	H	H	H	H	Me	H	

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Q
402	H	H	H	H	H	Me	
403	H	H	Me	H	H	H	
404	H	H	-CF ₃	H	H	H	
405	H	H	-CHF ₂	H	H	H	
406	H	H	H	-OCF ₃	H	H	
407	H	H	H	-OH	H	H	
408	H	H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	H	
409	H	H	H	H	H	-OCH ₃	
410	H	-OCH ₃	H	H	H	H	
411	H	Me	H	H	H	H	
412	Cl	-OCH ₃	H	H	H	H	
413	H	H	H	Et	H	H	
414	H	H	H	-OEt	H	H	
415	H	H	H	Br	H	H	
416	H	H	H	-OCH ₃	F	H	
417	H	H	F	-OCH ₃	H	H	
418	H	H	-SCH ₃	-OCH ₃	H	H	
419	H	H	H		H	H	
420	H	H		-OCH ₃	H	H	
421	H	H	H		H	H	

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Q
422	H	H		H	H	H	
423		H	H	-OCH ₃	H	H	
424		H	H	-OCH ₃	H	H	
425		H	H	-OCH ₃	H	H	
426		H	H	-OCH ₃	H	H	
427		H	H	-OCH ₃	H	H	
428		H	H	-OCH ₃	H	H	
429		H	H	-OCH ₃	H	H	
430		H	H	-OCH ₃	H	H	
431		H	H	-OCH ₃	H	H	
432		-OCH ₃	H	H	H	H	
433		-OCH ₃	H	H	H	H	
434		-OCH ₃	H	H	H	H	
435		H	H	H	H	H	
436		H	H	H	H	H	
437		H	H	-OCH ₃	H	H	
438		H	-OCH ₃	H	H	H	
439		H	-OCH ₃	H	H	H	
440		H	H	-OCH ₃	H	H	

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Q
441	H		H	H	H	H	
442		H	-OCH ₃	H	H	H	
443		H	H	-OCH ₃	H	H	
444		H	H	-OCH ₃	H	H	
445		-OH	H	H	H	H	
446		-OH	H	H	H	H	
447		-OH	H	H	H	H	
448		-OH	H	H	H	H	
449		H	H	H	H	H	
450		H	H	-OCH ₃	H	H	
451		H	H	-OCH ₃	H	H	
452		H	H	-OCH ₃	H	H	
453		H	H	-OCH ₃	H	H	
454		H	H	-OCH ₃	H	H	
455		H	-OCH ₃	H	H	H	
456		H	H	-OCH ₃	H	H	

Ejemplo 50

Estudios Biológicos

Ensayo peptídico FRET de complejo de proteasa NS3/4A de VHC recombinante

El propósito de este ensayo *in vitro* era medir la inhibición de complejos de proteasa NS3 de VHC, obtenidos a partir de la cepa BMS, la cepa H77C o la cepa J416S, como se ha descrito más adelante, mediante compuestos de la presente invención. Este ensayo proporciona un indicio de cuán eficaces serían los compuestos de la presente invención en la inhibición de la actividad proteolítica de VHC.

Se obtuvo suero a partir de un paciente infectado con VHC del Dr. T. Wright, Hospital de San Francisco. Una matriz de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario) de longitud completa producida por ingeniería genética del genoma de VHC (cepa BMS) se construyó a partir de fragmentos de ADN obtenidos por transcripción inversa-PCR (RT-PCR) de ARN de suero (ácido ribonucleico) y usando cebadores seleccionados en base a la homología entre cepas 1a de otro genotipo. A partir de la determinación de la secuencia de genoma completa, se asignó un genotipo 1a al aislado de VHC de acuerdo con la clasificación de Simmonds y col. (véase P Simmonds, KA Rose, S Gram., SW Chan, F McOmish, BC Dow, EA Folletto, PL Yap y H Mariden, J. Clon. Microbiol., 31(5), 1493-1503 (1993)). La secuencia de aminoácidos de la región no estructural, NS2-5B, demostró ser > del 97% idéntica al genotipo 1a de VHC (H77C) y el 87% idéntica al genotipo 1b (J4L6S). Los clones infecciosos, H77C (genotipo 1a) y J4L6S (genotipo 1b)

se obtuvieron a partir de R Purcell (NIH) y las secuencias se publican en el Genbank (AAB67036, véase Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. y Bukh, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(16), 8738-8743 (1997); AF054247, véase Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H. y Bukh, J. Virology 244(1), 161-172 (1998)).

Se usaron las cepas H77C y J4L6S para la producción de complejos de proteasa NS3/4A recombinantes. El ADN que codifica el complejo de proteasa NS3/4A de VHC recombinante (aminoácidos 1027 a 1711) de estas cepas se manipularon como ha descrito P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkuhler C, De Francesco R. Biochemistry. 38(17): 5620-32, (1999)). Brevemente, se añadió un tramo final solubilizante de tres lisinas al extremo 3' de la región codificante NS4A. Se cambió la cisteína en la posición P1 del sitio de escisión NS4A-NS4B (aminoácido 1711) a una glicina para evitar la escisión proteolítica de la marca de lisina. Además, se introdujo una mutación de cisteína a serina mediante PCR en la posición de aminoácido 1454 para evitar la escisión autolítica en el dominio de helicasa NS3. El fragmento de ADN variante se clonó en el vector de expresión bacteriana pET21b (Novagen) y el complejo NS3/4A se expresó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, De Francesco R., J Virol 72(8): 6758-69 (1998)) con modificaciones. Brevemente, se indujo la expresión de NS3/4A con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM durante 22 h a 20°C. Una fermentación típica (10 l) produjo aproximadamente 80 g de pasta celular húmeda. Las células se resuspendieron en tapón de lisis (10 ml/g) constituido por ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etano sulfónico) (HEPES), pH 7,5, glicerol al 20%, cloruro de sodio (NaCl) 500 mM, Triton-X100 al 0,5%, 1 microgramo/mililitro ("µg/ml") de lisozima, cloruro de magnesio (MgCl₂) 5 mM, 1 µg/ml de DnaseI, β -mercaptoetanol (β ME) 5 mM, inhibidor de proteasa-ácido etilendiamino tetracético (EDTA) libre (Roche), se homogeneizaron e incubaron durante 20 minutos a 4°C. El homogenado se sonicó y clarificó mediante ultracentrifugación a 235000 g durante 1 h a 4°C. Se añadió imidazol al sobrenadante hasta una concentración final de 15 mM y el pH se ajustó a 8,0. El extracto de proteína cruda se cargó sobre una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) preequilibrada con tampón B (HEPES 25 mM, pH 8,0, glicerol al 20%, NaCl 500 mM, Triton-X100 al 0,5%, imidazol 15 mM, β ME 5 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón C (igual que el tampón B excepto que con Triton-X100 al 0,2%). La proteína se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón D (igual que el tampón C excepto que con imidazol 200 mM).

Las fracciones que contenían complejo de proteasa NS3/4A se combinaron y se cargaron sobre una columna de desalinización Superdex-S200 pre-equilibrada con tampón D (HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20%, NaCl 300 mM, Triton-X100 al 0,2%, β ME 10 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contenían complejo de proteasa NS3/4A se combinaron y se concentraron hasta aproximadamente 0,5 mg/ml. La pureza de los complejos de proteasa NS3/4A, obtenidos a partir de las cepas BMS, H77C y J4L6S, se calculó que fueron mayores del 90% mediante análisis de SDS-PAGE y espectrometría de masas.

La enzima se almacenó a -80°C, se descongeló en hielo y se diluyó antes del uso en tampón de ensayo. El sustrato usado para el ensayo de proteasa NS3/4A fue RET S1 (Resonance Energy Transfer Depsipeptide Substrate; AnaSpec, Inc. N° de cat. 22991) (péptido FRET), descrito por Taliani y col., en Anal. Biochem. 240(2): 60-67 (1996). La secuencia de este péptido se basa ligeramente en el sitio de escisión natural NS4A/NS4B excepto en que existe un enlace éster en lugar de una unión amida en el sitio de escisión. El sustrato peptídico se incubó con uno de los tres complejos NS3/4A recombinantes, en ausencia o presencia de un compuesto de la presente invención y se siguió la formación del producto de reacción fluorescente en tiempo real usando un Cytofluor Series 4000.

Los reactivos fueron los siguientes: Se obtuvieron HEPES y glicerol (Ultrapure) a partir de GIBCO-BRL. Se obtuvo dimetil sulfoxido (DMSO) en Sigma. Se obtuvo β -mercaptoetanol en Bio Rad.

Tampón de ensayo: HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,15 M, Triton al 0,1%; glicerol al 15%; β ME 10 mM. Sustrato: concentración final 2 µM (a partir de una solución madre 2 mM en DMSO almacenado a -20°C). NS3/4A de tipo 1a (1b) de VHC, concentración final 2-3 nM (a partir de una solución madre 5 µM en HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20%, NaCl 300 mM, Triton-X100 al 0,2%, β ME 10 mM). Para los compuestos con potencias que se acercaban al límite de ensayo, el ensayo se hizo más sensible mediante la adición de 50 µg/ml de Albúmina Sérica Bovina (Sigma) al tampón de ensayo y reduciendo la concentración de proteasa final hasta 300 pM.

El ensayo se realizó en una placa negra de poliestireno de 96 pocillos de Falcon. Cada pocillo contenía 25 microlitros ("µl") de complejo proteasa NS3/4A en tampón de ensayo, 50 µl de un compuesto de la presente invención en DMSO al 10%/tampón de ensayo y 25 µl de sustrato en tampón de ensayo. También se preparó un control (sin compuesto) en la misma placa de ensayo. El complejo de enzima se mezcló con compuesto o solución control durante 1 minuto antes de iniciar la reacción enzimática mediante la adición de sustrato. La placa de ensayo se leyó inmediatamente usando el Cytofluor Series 4000 (Perspectiva Biosystems). El instrumento se ajustó para leer una emisión de 340 nm y una excitación de 490 nm a 25°C. Las reacciones se siguieron generalmente durante aproximadamente 15 minutos.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$100 - [(\delta F_{\text{inh}} / \delta F_{\text{con}}) \times 100]$$

en la que δF es el cambio en la fluorescencia a lo largo del intervalo lineal de la curva. Se aplicó un ajuste de curva no lineal a los datos de inhibición-concentración y se calculó la concentración eficaz del 50% (CI₅₀) mediante el uso de software Excel XI-fit usando la ecuación, $y = A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$.

Se observó que todos los compuestos ensayados tenían CI_{50} de 1,2 μM o menos. Además, los compuestos de la presente invención, que se ensayaron frente a más de un tipo de complejo NS3/4A, se observó que tenían propiedades inhibitoras similares aunque los compuestos demostraron uniformemente mayor potencia frente a las cepas 1b en comparación con las cepas 1a.

Ensayos de Especificidad

Los ensayos de especificidad se realizaron para demostrar la selectividad de los compuestos de la presente invención para inhibir la proteasa NS3/4A de VHC en comparación con otras serinas o cisteína proteasas.

Las especificidades de los compuestos de la presente invención se determinaron frente a una diversidad de serina proteasas: elastasa de neutrófilos humana (HNE), elastasa pancreática porcina (PPE) y quimotripsina pancreática humana y una cisteína proteasa: cathepsina B hepática humana. En todos los casos se usó un protocolo de formato de placa de 96 pocillos usando sustrato colorimétrico p-nitroanilina (pNA) específico para cada enzima como se ha descrito previamente (PCT Solicitud de Patente N° WO 00/09543) con algunas modificaciones a los ensayos de serina proteasa. Todas las enzimas se obtuvieron en Sigma mientras que los sustratos se obtuvieron en Bachem.

Cada ensayo incluyó una preincubación con inhibidor de enzima de 2 horas a temperatura ambiente seguida de adición de sustrato e hidrólisis hasta ~ el 30% de conversión medido en un lector de microplaca Spectramax Pro. Las concentraciones del compuesto variaron de 100 a 0,4 micromolar (" μM ") dependiendo de su potencia.

Las condiciones finales de cada ensayo fueron las siguientes:

Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato (Tris-HCl) 50 milimolar (" mM ") pH 8, sulfato de sodio (Na_2SO_4) 0,5 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DMSO al 3%, Tween-20 al 0,01% con:

succ-AAA-pNA 133 μM y HNE 20 nM o PPE 8 nM; succ-AAPF-pNA 100 μM y quimotripsina 250 pM.

$NaHPO_4$ (fosfato de hidrógeno de sodio) 100 mM, pH 6, EDTA 0,1 mM, DMSO al 3%, TCEP 1 mM (Tris (2-carboxietil)fosfina clorhidrato), Tween-20 al 0,01%, Z-FR-pNA 30 μM y Cathepsina B 5 nM (reserva de enzima activada en tampón que contenía TCEP 20 mM antes del uso).

El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula:

$$[1 - ((UV_{inh} - UV_{blanco}) / (UV_{ctl} - UV_{blanco}))] \times 100$$

Se aplicó un ajuste de curva no lineal a los datos de concentración de inhibición y se calculó la concentración eficaz del 50% (CI_{50}) mediante el uso de software Excel XI-fit.

En la presente invención se utilizaron ensayos de Replicón de VHC y se prepararon, condujeron y validaron de la forma siguiente:

Generación de Replicón de VHC

Se estableció un sistema de células enteras de Replicón de VHC como ha descrito Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R., Science 285(5424): 110-3 (1999). Este sistema permitió evaluar los efectos de los compuestos de Proteasa de VHC sobre la replicación del ARN de VHC. Brevemente, usando la secuencia de la cepa 1b de VHC descrita en el documento Lohmann (Número de entrada: AJ238799), se sintetizó un ADNc de VHC mediante Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) y después el replicón de longitud completa se ensambló en un plásmido pGEM9zf(+) (promega, Madison, WI) usando técnicas de biología molecular convencionales. El replicón está constituido por (i) el UTR 5' de VHC condensado con los primeros 12 aminoácidos de la proteína de cápside, (ii) el gen de neomicina fosfotransferasa (neo), (iii) los IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y (iv) los genes NS3 a NS5B de VHC y el UTR 3' de VHC. Los ADN de plásmidos se linealizaron con *Scal* y los transcritos de ARN se sintetizaron *in vitro* usando el kit de transcripción T7 MegaScript (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las direcciones del fabricante. Para generar líneas celulares, se electroporaron 4×10^6 células Huh-7 (proporcionadas gentilmente por R. Bartenschlager y disponibles en Health Science Research Resources Bank, Japan Health Sciences Foundation) (GenePulser System, Bio-Rad) con 10 microgramos (" μg ") de transcrito de ARN y se sembraron en placas en platos de 100 mm. Después de 24 horas, se añadió medio selectivo que contenía 1,0 miligramos/mililitro (" mg/ml ") de G418 y se cambió el medio cada 3 a 5 días. Aproximadamente 4 semanas después de la electroporación, eran visibles colonias pequeñas que se aislaron y se expandieron para análisis adicional. Estas líneas celulares se mantuvieron a 37°C, CO_2 al 5%, humedad relativa del 100% en DMEM (n° de cat. 11965-084) Gibco-BRL, Rockvill, MD, con suero bovino inactivado por calor al 10% (Sigma), 10 ml de 100X penicilina/estreptomicina (n° de cat. 15140-122) Gibco-BRL, Rockville, MD, Geneticin (n° Cat. 10131-027) Gibco-BRL, Rockville, MD a 1 mg/ml. Una de las líneas celulares (depositada como N° de Entrada de ATCC PTA-4583 en la Colección Americana de Cultivos Tipo) que tenía aproximadamente 3.000 copias de replicón ARN de VHC/célula se usó para el desarrollo del ensayo (células replicón 1b-377-neo de VHC).

Ensayo FRET

Se cultivaron células Huh7, que expresan constitutivamente el replicón de VHC, el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino (FCS) al 10% y 1 mg/ml de G418 (Gibco-BRL). Las células se sembraron la noche anterior ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en placas estériles de cultivo tisular de 96 pocillos. Se prepararon controles con compuesto y sin compuesto en DMEM que contenía FCS al 4%, penicilina/estreptomicina 1:100, L-glutamina 1:100 y DMSO al 5% en la placa de dilución (concentración final de DMSO al 0,5% en el ensayo). Las mezclas de compuesto/DMSO se añadieron a las células y se incubaron durante 4 días a 37°C. Después de 4 días, se evaluó en primer lugar la citotoxicidad de las células usando Azul de alamar (Trek Diagnoststic Systems) para una lectura de CC_{50} . Se determinó la toxicidad del compuesto (CC_{50}) mediante la adición de 1/10 volumen de Azul de alamar al medio en el que se incubaban las células. Después de 4 h, se leyó la señal de fluorescencia de capa pocillo, con una longitud de onda de excitación a 530 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm, usando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). Después las placas se enjuagaron abundantemente con Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) (3 veces 150 μ l). Las células se lisaron con 25 μ l de un reactivo de ensayo de lisis que contenía sustrato de proteasa de VHC (reactivo Luciferasa de lisis de cultivo celular 5X células (Promega n° E153A) diluido hasta 1X con agua destilada, NaCl añadido hasta 150 mM final, el péptido FRET diluido hasta 10 μ M final a partir de una reserva 2 mM en DMSO al 100%). El sustrato proteasa de VHC (péptido FRET; AnaSpec, Inc. n° de cat. 22991, descrito por Taliani y col. en Anal. Biochem. 240 (2): 60-67 (1996)) contiene un donante de fluorescencia, EDANS, cerca de un extremo del péptido y un receptor, DABCYL, cerca del otro extremo. La fluorescencia del péptido se inactiva mediante transferencia de energía de resonancia intermolecular (RET) entre el donante y el receptor, pero a medida que la proteasa NS3 escinde el péptido los productos se liberan a partir de la inactivación del RET y la fluorescencia del donante se vuelve aparente. Después la placa se puso en el instrumento Cytofluor 4000 que se había ajustado a 340 nm de excitación/490 nm de emisión, modo automático durante 21 ciclos y la placa se leyó en un modo cinético a 25°C. Las reacciones se siguieron generalmente durante aproximadamente 15 minutos.

El porcentaje de inhibición tanto para la eficacia como para la citotoxicidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$100 - [(\delta F_{inh} / \delta F_{con}) \times 100]$$

en la que δF es el cambio en la fluorescencia a lo largo del intervalo lineal de la curva. Se aplicó un ajuste de curva no lineal a los datos de concentración de inhibición y se calculó la concentración eficaz del 50% (CE_{50} y CC_{50}) mediante el uso de software Excel XI-fit usando la ecuación, $y = A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$.

Ensayo de Luciferasa

Como un ensayo secundario, las determinaciones de CE_{50} a partir del ensayo FRET de replicón se confirmaron en un ensayo indicador de luciferasa. La utilización de un ensayo de indicador de luciferasa de replicón se describió en primer lugar en Krieger y col. (Krieger N, Lohmann V, y Bartenschlager R, J. Virol. 75(10): 4614-4624 (2001)). La construcción de replicón descrita para el ensayo FRET se modificó mediante el reemplazo del gen de resistencia a la neomicina con un casete que contenía gen de Luciferasa Renilla condensado con una secuencia que representa un sitio de escisión NS3 (sitio NS4A/B), seguido del gen de la resistencia a Blastidicina (sitios de restricción AscI/PmeI usados para la subclonación). También se introdujo la mutación adaptativa en la posición 1179 (serina a isoleucina) (Blight KJ, Kolykhalov, AA, Rice, CM, Science 290(5498): 1972-1974). Se seleccionó una línea celular que contenía el replicón y se mantuvo en 1,25 μ g/ml de Blastidicina. El ensayo del indicador de Luciferasa se preparó sembrando las células de replicón la noche anterior a una densidad de 7000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Un día después, el medio se cambió a DMEM fresco que contenía FBS al 4% y se prepararon diluciones del compuesto y se añadieron a una concentración final de DMSO al 0,5% (volumen de medio final de 150 μ l). A continuación de una incubación adicional de 4 días en una incubadora a 37°C/CO₂ al 5%, las células se analizaron para la actividad de luciferasa Renilla usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Promega Dual-Glo. Se retiró medio (100 μ l) de cada pocillo. A los 50 μ l restantes de medio, se añadieron 50 μ l de Reactivo de Luciferasa Dual-Glo y las placas se agitaron durante 10 minutos hasta 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadió Reactivo Dual-Glo Stop & Glo (50 μ l) a cada pocillo y las placas se agitaron de nuevo durante 10 minutos hasta 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Las placas se leyeron en un Packard TopCount NXT usando un programa de luminiscencia.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de control} = \frac{\text{señal de luciferasa promedio en pocillos experimentales (con compuesto)}}{\text{señal de luciferasa promedio en pocillos control en DMSO (sin compuesto)}}$$

Los valores se graficaron y analizaron usando XLFit para obtener el valor de CE_{50} .

Los compuestos representativos de la invención se evaluaron en el ensayo de enzima recombinante de proteasa NS3/4A de VHC, el ensayo basado en células de replicón de VHC y/o en varios de los ensayos de especificidad descritos. Por ejemplo, se observó que el Compuesto 2 tiene una CI_{50} de 26 nM frente a la cepa BMS de proteasa NS3/4A en el ensayo enzimático. Se obtuvieron valores de potencia similares con las cepas publicadas H77C (CI_{50} de 4,2 nM) y J4L6S (CI_{50} de 1,9 nM). El valor de CE_{50} en el ensayo de replicón fue 146 nM.

ES 2 320 771 T3

En los ensayos de especificidad, se observó que el mismo compuesto tenía la actividad siguiente: HNE > 100 μM ; PPE > 100 μM ; Quimotripsina > 100 μM y Catepsina B > 100 μM . Estos resultados indican que esta familia de compuestos es altamente específica para la proteasa NS3 y muchos de estos miembros inhiben la replicación del replicón de VHC.

Se observó que los compuestos ensayados tenían actividades en los siguientes intervalos:

Intervalos de Actividad de CI_{50} (Cepa BMS NS3/4A): A es < 50 μM ; B es < 5 μM ; C es < 0,5 μM ;

D es < 0,05 μM

Intervalo de Actividad de CE_{50} (para los compuestos ensayados): A es < 50 μM ; B es < 5 μM ; C es < 0,5 μM ;

D es < 0,05 μM .

Tablas 6 y 7

Tablas de Actividad del Compuesto

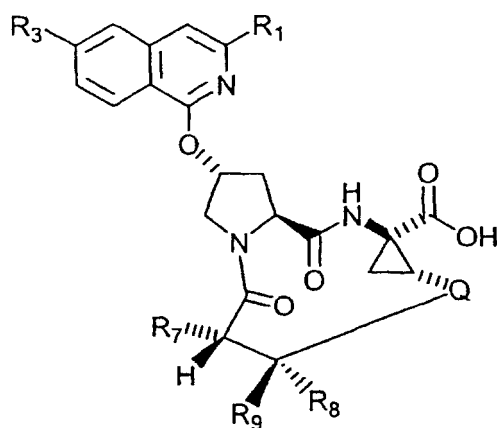


TABLA 6

Comp.	R ₁	R ₃	R ₇	R ₈	R ₉	Q	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)
1							C	B
17A							D	C
18A							C	B
27							C	B
61							B	A
79							A	A

Compd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₈	R ₉	Q	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
84							C	B
140							A	NT
143							C	B
144							B	A

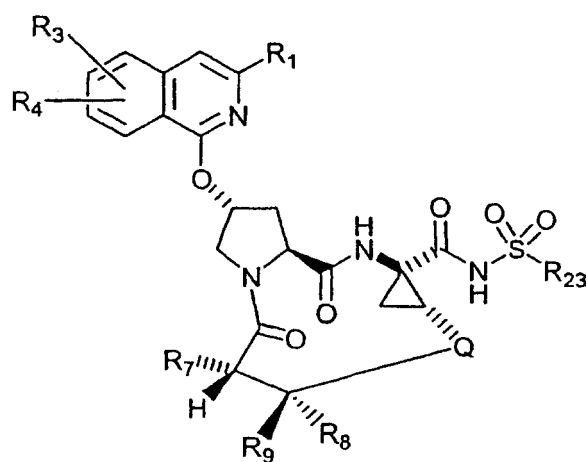


TABLA 7

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₂ , R ₄	R ₄	R ₅	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
2			H, H					D	C
3			H, H					D	C
4			H, H					D	D
5			H, H					D	C
6			H, H					D	D
7			H, H					D	D
8			H, H					D	D
9			H, H					D	D
10			H, H					D	D
11			H, H					D	C
12			H, H					D	D
13			H, H					D	D
14			H, H					D	D
15			H, H					D	D

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
16			H, H					D	D
17B			6-OMe, H					D	D
18 B			6-OMe, H					D	D
19			6-OMe, H					D	C
20			H, H					D	D
21			H, H					D	C
22			H, H					D	D
23			H, H					D	D
24			H, H					D	C
25			H, H					D	B
26			H, H					D	C
28			6-OMe, H					D	D
29			6-OMe, H					D	D
30			6-OMe, H					D	D

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Cl : 50 (n M)	CE 50 (n M)
31			6-OMe, H					D	D
32			6-OMe, H					D	D
33			6-OMe, H					D	D
34			6-OMe, H					D	D
35			6-OMe, H					D	D
36			6-OMe, H					D	D
37			6-OMe, H					D	D
38			6-OMe, H					D	D
39			6-OMe, H					D	D
40			6-OMe, H					D	C
41			6-OMe, H					D	D
42			6-OMe, H					D	D
43			6-OMe, H					D	D
44			6-OMe, H					D	D

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Q	CI 50 (a M)	CE 50 (a M)
45			6-OMe, H					D	D
46			6-OMe, H					D	D
47			6-OMe, H					D	D
48			6-OMe, H					D	C
49			6-OMe, H					C	B
50			H, H					D	D
51			H, H					D	D
52			H, H					D	D
53			6-OMe, H					D	D
54			6-OMe, H					D	D
55			H, H					D	D
56			H, H					D	D
57			H, H					D	D
58			H, H					D	D

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₅	R ₇	Q	CI 50 (n M)	CE 50 (n M)
59			H, H					D	D
60			6-OMe, H					D	D
62			6-OMe, H					D	C
63			6-OMe, H					D	C
64			6-OMe, H					D	C
65			6-OMe, H					D	D
66			6-OMe, H					D	C
67			6-OMe, H					D	C
68			6-OMe, H					D	C
69			6-OMe, H					D	D
70			6-OMe, H					D	C
71			6-OMe, H					D	C
72			6-OMe, H					D	C
73			6-OMe, H					D	C

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
74			6-OMe, H					D	D
75			6-OMe, H					D	D
76			6-OMe, 7-Cl					D	D
77			5-OMe, H					D	D
78			5-Cl, H					D	D
80			6-OMe, H					D	C
81			6-OMe, H					D	C
82			6-OMe, H					D	C
83			6-OMe, H					B	A
85			6-OMe, H					D	D
86			6-OMe, H					D	D
87			6-OMe, H					D	D
88			6-OMe, H					D	D
89			6-OMe, H					D	D

ES 2 320 771 T3

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
90			6-OMe, H					D	D
91			6-OMe, H					D	D
92			6-OMe, H					D	D
93			6-OMe, H					D	D
94			6-OMe, H					D	D
95			6-OMe, H					D	D
96			6-OMe, H					D	D
97			6-OMe, H					D	D
98			6-OMe, H					D	D
99			6-OMe, H					D	D
100			6-OMe, H					D	D
101			6-OMe, H					D	D
102			6-OMe, H					D	D
103			6-OMe, H					D	D
104			6-OMe, H					D	C

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₄	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (a M)	CE 50 (a M)
105			6-OMe, H					D	C
106			6-OMe, H					D	B
107			6-OMe, H					D	D
108			6-OMe, H					D	D
109			6-OMe, H					D	D
110			6-OMe, H					D	D
111			6-OMe, H					D	D
112			6-OMe, H					D	D

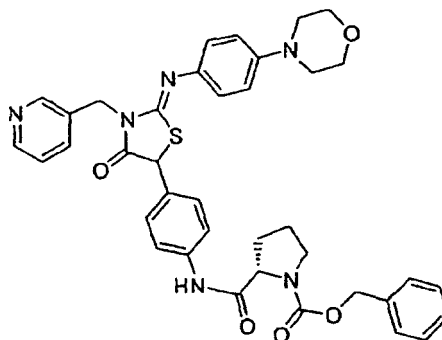
Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₁	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
113			6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
114			6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
115		-CH ₂ -H	6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
116		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
117		-CH ₂ -H	6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			C	C
118		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
119		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
120		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	B
121		-CH ₂ -H	6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
122		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
123		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
124		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
125		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₁	R ₉	R ₇	Q	CI 50 (a M)	CE 50 (a M)
126			H, H					D	D
127			H, H					D	D
128			H, H					D	D
129			H, H					D	D
130			5-Cl, H					D	D
131			6-OMe, 7-Cl					D	D
132			5-F, 6-OMe					D	D
133			5-OMe, H					D	D
134			5,6-di- methoxy					D	D
135			6-OMe, H					D	D
136			6-OMe, H					D	D
137			6-OMe, H					D	D
138			H, H					D	D
139			H, H					D	D
141			6-OMe, H					C	B

Comp.	R ₂₃	R ₁	R ₃ , R ₄	R ₈	R ₉	R ₇	Q	Cl 50 (n M)	CE 50 (n M)
142			6-OMe, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
145		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
146		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	B
147		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	D
148		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
149		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
150		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
151		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
152		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C
153		-CH ₂ -H	H, H	-CH ₂ -H	-CH ₂ -H			D	C

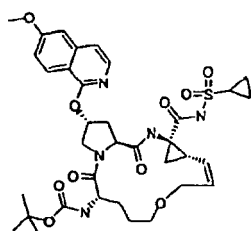
Estudios de Combinación

Ya que en las infecciones virales que siguen terapias de agente único con frecuencia se desarrolla resistencia clínica a los fármacos, existe la necesidad de evaluar las propiedades aditivas, antagonistas o sinérgicas de las terapias de combinación. Se usó el sistema de replicón de VHC, como se ha descrito anteriormente, para evaluar el uso potencial del inhibidor macrocíclico de proteasa NS3 en terapias de combinación con Intrón A e inhibidores dirigidos a otras proteínas de VHC. Se ensayaron tres antivirales de VHC, Intrón A (Interferón alfa-2b recombinante) un inhibidor NS5A de VHC que tiene la estructura siguiente:

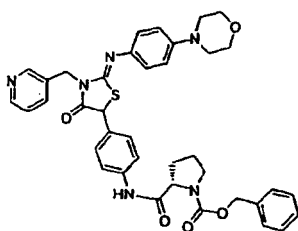


MS(ESI) m/z = 691,2 (MH^+); HPLC tr 1,21 min; Pureza (el 99%), y un inhibidor de replicasa NS5B (compuesto 2006; documento WO 03/010141), en combinaciones de dos fármacos con el compuesto 28 inhibidor de proteasa NS3 de VHC macrocíclico. Además, también se ensayó el compuesto 28 en combinaciones de tres fármacos con los inhibidores NS5A y NS5B.

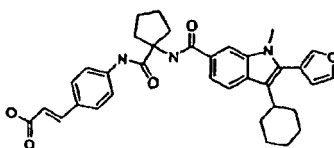
Para los experimentos mostrados en las Tablas 8 y 9, se ensayaron inhibidores a once concentraciones cada uno. Se prepararon soluciones de reserva de 200x de cada concentración de inhibidor mediante diluciones dobles o triples en DMSO antes de la adición de células/medio. Los fármacos se ensayaron como monoterapias y en combinación con el inhibidor de proteasa NS3 a diversas proporciones de concentración. Las células se expusieron a compuestos durante 4 días y después se determinó la cantidad de inhibición de VHC usando el ensayo FRET. Las citotoxicidades potenciales de estos agentes combinados también se analizaron en paralelo mediante tinción de azul de alamar. Los valores CC_{50} para los compuestos presentados fueron mayores que la concentración de inhibidor ensayado más alta. Se determinó el grado de antagonismo, aditividad o sinergia a lo largo de un intervalo de concentraciones de fármaco y las curvas de respuesta de combinación se ajustaron para evaluar los efectos antivirales de las combinaciones de tratamiento de fármacos. Las proporciones de concentración se analizaron usando el método de Chou (Chou, Ting-Chao, y Rideout (Editors), (1991) Synergism and Antagonism in Chemotherapy, P. 61-101, Academic Press, New York). Las Tablas 8 y 9 indican los valores estimados de CE_{50} para los compuestos ensayados, así como los índices de combinación (IC). Todas las estimaciones se calcularon usando SAS Proc NLIN y una logística de dos parámetros. Todos los índices de combinación se ensayaron para la desviación de la aditividad usando procedimientos de isoblograma. También se calcularon los intervalos de confianza asintótica para cada uno de los índices de combinación. Estos intervalos se usan para ensayar la desviación a partir de la aditividad comparando las uniones con uno - una unión inferior del intervalo mayor de 1 indica antagonismo, una unión superior de menos de 1 indica sinergia y un valor de 1 contenido en el intervalo indica aditividad. Además del enfoque del índice de combinación, anteriormente, también se usó el Enfoque de Superficie de Respuesta Universal (URSA) para evaluar los efectos antivirales de combinaciones de inhibidores NS5A o NS5B con el inhibidor de proteasa NS3. Los experimentos se condujeron en un formato matricial con 8 concentraciones de inhibidor de proteasa NS3 cruzadas frente a 10 concentraciones de inhibidor de NS5A o NS5B en cada una de las tres placas. Se prepararon soluciones de reserva de 200x de cada concentración de inhibidor mediante dilución triple en DMSO. Los efectos sobre la replicación se evaluaron en el sistema de replicón de VHC como se ha descrito anteriormente. Los datos se analizaron usando el URSA como se ha descrito en Greco, Park y Rustum (Greco, Park, Sook, y Rustum (1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum y 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327). La interacción de los dos fármacos se evaluó mediante el uso de regresión no lineal con un algoritmo de bisección. Se estimaron 7 parámetros. Los mismos incluyen la respuesta mínima o respuesta en ausencia del fármaco, la respuesta máxima o respuesta en presencia del fármaco infinito, CE_{50} de los dos fármacos, parámetros dependiente de los dos fármacos y el parámetro α de interacción de fármacos que proporciona la evaluación de sinergia, antagonismo o aditividad. Las Tablas 10 y 11 presentan parámetros clave estimados y errores típicos. La aditividad está implicada cuando α es igual a cero, sinergia si el parámetro de interacción es mayor que cero y antagonismo cuando el parámetro de interacción es menor que cero. También se presenta el intervalo de confianza del parámetro de interacción. Este intervalo se usa para ensayar la desviación a partir de la aditividad comparando las uniones a cero-una unión inferior del intervalo mayor que cero indica sinergia, una unión superior de menos de cero indica antagonismo y un valor de cero contenido de un intervalo indica aditividad.



Inhibidor de Proteasa
Compuesto 28



Inhibidor de NS5A



Inhibidor de Replicasa
Compuesto Y, documento WO 03/010141

La Tabla 8 resume los datos de las combinaciones de compuesto 28 con Intrón A. También se presentan los valores de CE_{50} para cada monoterapia. En dos experimentos, la combinación de compuesto 28 con Intrón A produjo efectos o sinérgicos o de aditividad en las dosis eficaces del 75%, 90% y 95%.

Los efectos del compuesto 28 en combinación con el inhibidor NS5A de VHC se resumen en la Tabla 9. Se observó sinergia o aditividad en dos experimentos en las dosis eficaces del 75, 90 y 95% del compuesto 28. Más importante, no se observó antagonismo farmacológico en las dosis eficaces del 75, 90 o del 95% cuando el compuesto 28 se combinó con el inhibidor NS5A de VHC o Interferón alfa-2b. Los experimentos de seguimiento que usaron estas mismas combinaciones de inhibidor en el formato de matriz (Tabla 10) produjeron resultados similares a los experimentos de índice de combinación; aditividad para la combinación del inhibidor NS5A con el compuesto 28.

El formato de matriz también se usó para examinar la actividad de combinaciones del inhibidor NS5B de VHC, con el compuesto 28 (Tabla 11). En dos experimentos, se observó aditividad global.

El compuesto 28 también se ensayó en experimentos de combinación de 3 fármacos con el inhibidor NS5A y el inhibidor NS5B (Tabla 12). Las concentraciones iniciales de las monoterapias estaban constituidas por una solución del inhibidor NS5A $0,667 \mu\text{M}$, una solución del compuesto 28 $0,3 \mu\text{M}$ y una solución del inhibidor NS5B $2,5 \mu\text{M}$. La concentración inicial de la combinación triple contenía una mezcla de 1/3 de cada una de las concentraciones anteriores. Se obtuvieron curvas de dosis respuesta para las tres monoterapias y la terapia de combinación triple usando diluciones triples y se realizó el análisis de los datos como se ha descrito anteriormente para los experimentos de índice de combinación. Se observaron efectos sinérgicos usando la combinación triple. No se observó antagonismo farmacológico en las dosis eficaces del 75, 90 o del 95% con la combinación de 3 fármacos. Estos resultados demuestran que el tratamiento de combinación de células de replicación con el inhibidor de proteasa NS3 de VHC, compuesto 28 e Intrón A y/o inhibidores dirigidos a NS5A de VHC y/o NS5B, produjeron efectos antivirales aditivos a sinérgicos. La capacidad de usar estos inhibidores de proteasa NS3 en terapia de combinación puede proporcionar ventajas fundamentales frente a los tratamientos de fármaco único para el tratamiento de VHC.

ES 2 320 771 T3

TABLA 8

Combinaciones de Dos Fármacos con Interferón alfa-2b

Experimento	CE ₅₀ de inhibidor de proteasa NS3, µM	CE ₅₀ de Interferón alfa-2b, unidades por ml	Proporción molar, inhibidor de proteasa NS3 a Interferón alfa-2b	Índices de Combinación (intervalo de confianza)			Resultado global
				75% eficaz	90% eficaz	95% eficaz	
1	0,008	20	2:5	0,67 (0,53, 0,8)	0,59 (0,4, 0,77)	0,56 (0,33, 0,79)	Sinergia
			1:1	0,57 (0,48, 0,66)	0,5 (0,38, 0,62)	0,46 (0,32, 0,61)	Sinergia
			4:25	1,02 (0,88, 1,16)	0,64 (0,5, 0,78)	0,5 (0,36, 0,64)	Aditividad al 75%; Sinergia al 90, 95%
2	0,01	51	2:5	0,59 (0,43, 0,74)	0,38 (0,22, 0,54)	0,28 (0,13, 0,43)	Sinergia
			1:1	0,50 (0,44, 0,56)	0,33 (0,27, 0,39)	0,25 (0,19, 0,31)	Sinergia
			4:25	1,03 (0,87, 1,19)	0,65 (0,50, 0,81)	0,48 (0,33, 0,63)	Aditividad al 75%; Sinergia al 90, 95%

ES 2 320 771 T3

TABLA 9

Combinaciones de Dos Fármacos con un Inhibidor NS5A

Experimento	CE ₅₀ de inhibidor de proteasa NS3, μ M	CE ₅₀ de inhibidor NS5A, μ M	Proporción molar, inhibidor de proteasa NS3 a inhibidor NS5A	Indices de Combinación (intervalo de confianza)			Resultado global
				75% eficaz	90% eficaz	95% eficaz	
1	0,009	0,043	3:100	0,66 (0,47,0,85)	0,61 (0,35,0,88)	0,59 (0,27,0,91)	Sinergia
			3:250	0,57 (0,41, 0,73)	0,62 (0,36, 0,89)	0,66 (0,3, 1,02)	Aditividad al 95%; Sinergia al 75, 90%
			3:40	0,73 (0,55, 0,9)	0,64 (0,43, 0,85)	0,59 (0,34, 0,83)	Sinergia
2	0,011	0,005	1:5	1,1 (0,91, 1,3)	1,15 (0,82, 1,47)	1,18 (0,75, 1,61)	Aditividad
			2:25	1,24 (1,0, 1,49)	1,19 (0,81, 1,58)	1,16 (0,67, 1,65)	Aditividad
			1:2	1,0 (0,88, 1,14)	0,83 (0,67, 1,0)	0,73 (0,54, 0,92)	Aditividad al 75%; Sinergia al 90, 95%

TABLA 10

Combinaciones de Dos Fármacos con un Inhibidor de NS5A: Estudios de Matriz

		Error Típico	Resultado Global
CE ₅₀ Compuesto 28, μ M	0,009	0,52	
CE ₅₀ inhibidor NS5A, μ M	0,008	0,46	
Parámetro de Interacción alfa (intervalo de confianza)	0,63 (-0,09, 1,36)	0,37	Aditividad

ES 2 320 771 T3

TABLA 11

Combinaciones de Dos Fármacos con un Inhibidor NS5B: Estudios de Matriz

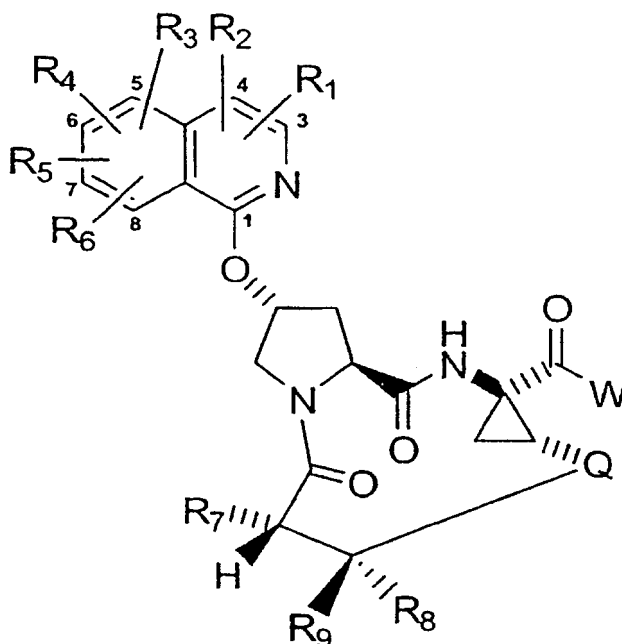
	Experimento 1	Error Típico	Resultado Global	Experimento 2	Error Típico	Resultado Global
CE ₅₀ Compuesto 28, µM	0,015	0,53		0,020	0,87	
CE ₅₀ inhibidor NS5B, µM	0,059	2,63		0,050	2,39	
Parámetro de Interacción alfa (intervalo de confianza)	0,47 (-0,05, 1,0)	0,27	Aditividad	0,31 (-0,22, 0,83)	0,27	Aditividad

TABLA 12: Estudios de Combinación de Tres Fármacos

Experimento	CE ₅₀ inhibidor NS3 Pr, μM	CE ₅₀ inhibidor NS5A, μM	CE ₅₀ inhibidor NS5B, μM	Proporción molar, inhibidor de proteasa NS3 a inhibidor NS5A a inhibidor NS5B	Indices de Combinación (intervalo de confianza)	Resultado Global
					75 eficaz	
1	0,008	0,005	0,052	9:20:75	0,78 (0,62, 0,94)	Sinergia
2	0,009	0,009	0,064	9:20:75	0,71 (0,6, 0,81)	Sinergia

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



I

en la que:

- (a) R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} ; cicloalquilo C_{3-7} ; alcoxi C_{1-6} ; cicloalcoxi C_{3-7} ; halo-alcoxi C_{1-6} ; halo-alquilo C_{1-6} ; ciano; halo; hidroxilo; alcanóilo C_{1-6} ; nitro; amino; mono o di-alquil (C_{1-6})-amina; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amina; mono o di-alquil C_{1-6} -amida; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amida; carboxilo; carboxiéster (C_{1-6}); tiol; tioalquilo C_{1-6} ; alquilsulfóxido C_{1-6} ; alquil C_{1-6} -sulfona; alquil C_{1-6} -sulfonamida; arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C_{7-14} ; ariloxi C_{6-10} ; alquilariloxi C_{7-14} ; heteroariloxi monocíclico de 4-7 miembros; o Het; dichos R_1 a R_6 opcionalmente unidos al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C_{1-6} ;
- (b) R_7 es NH_2 o $-NR_{10}R_{11}$; donde R_{10} es alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , $C(O)-NR_{12}R_{13}$, $C(O)-OR_{14}$, $C(O)-SR_{15}$ o $-C(O)-R_{16}$; R_{11} es H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} , con la condición de que si R_{12} o R_{13} es H entonces R_{11} es H;
- R_{12} y R_{13} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; o arilo; y donde R_{12} y R_{13} junto con el nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo de 4-7 miembros; R_{14} y R_{15} son cada uno independientemente alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; arilo o Het; R_{16} es H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilocicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; arilo o Het;
- (c) R_8 y R_9 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con halo, o alcoxi C_{1-3} , o haloalcoxi C_{1-3} ;
- (d) Q es una cadena C_{3-9} saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; $-C(O)-R_{18}$, $C(O)-OR_{19}$, $C(O)-NR_{20}R_{21}$ o $-SO_2R_{22}$; R_{18} , R_{20} y R_{21} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; R_{19} es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; R_{22} es arilo, alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-6} , ciano o haloalcoxi C_{1-6} ; y

- (e) W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄; en las que n es 1 ó 2, R₂₃ es alquilo C₁₋₈, alquilocicloalquilo C₄₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C₁₋₃, ciano, amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amina, mono o di-alquil C₁₋₆-amida o carboxilato; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het;

5

o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ se une a la posición C₃ y se selecciona entre H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀ o Het.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₂, R₃, y R₄ se unen a las posiciones C₄, C₅ y C₆, respectivamente, y cada uno se selecciona independientemente entre H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₇)-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀; o Het.

15

4. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₅ y R₆ se unen a las posiciones C₇ y C₈, respectivamente, y cada uno se selecciona independientemente entre H; alquilo C₁₋₃; cicloalquilo C₃₋₄; alcoxi C₁₋₃; cicloalcoxi C₃₋₄; halo-alcoxi C₁₋₃; halo-alquilo C₁₋₃; ciano; halo; hidroxilo; alcanofilo C₁₋₃; mono o di-alquil (C₁₋₃)-amina; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amina; mono o di-alquil C₁₋₃-amida; mono o di-cicloalquil (C₃₋₄)-amida; o carboxilo.

20

5. El compuesto de la reivindicación 1 en el que Q es una cadena C₃₋₉ saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S(O)_m; donde m es 0, 1 ó 2 o NR₁₇, donde R₁₇ es H; alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₁₋₆, -C(O)-R₁₈, C(O)-OR₁₉, C(O)-NR₂₀R₂₁ o -SO₂R₂₂.

25

6. El compuesto de la reivindicación 5 en la que R₁₈, R₂₀ y R₂₁ son cada uno independientemente H; alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; R₁₉ es alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆; y R₂₂ es arilo, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₁₋₆, cada uno opcionalmente sustituido con halo.

30

7. El compuesto de la reivindicación 1 en el que W es OH, -NH-SO_n-R₂₃ o NH-SO_n-R₂₄ que n es 1 ó 2, R₂₃ es cicloalquilo C₃₋₇ sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C₇₋₉-arilo o alquilo C₁₋₄; y R₂₄ es arilo C₆₋₁₀ o Het.

35

8. Un compuesto de fórmula II:

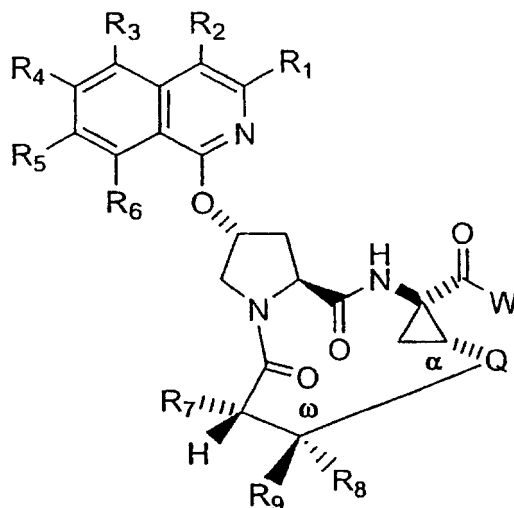
40

45

50

55

60



II

en la que:

65

- (a) R₁ es H; alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₃₋₇; alcoxi C₁₋₆; cicloalcoxi C₃₋₇; halo-alcoxi C₁₋₆; halo-alquilo C₁₋₆; ciano; halo; alcanofilo C₁₋₆; mono o di-alquil (C₁₋₆)-amina; mono o di-alquil C₁₋₆-amida; carboxilo; arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C₇₋₁₄; ariloxi C₆₋₁₀ o Het; dicho R₁ opcionalmente unido al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C₁₋₆; R₂, R₃ y R₄ son cada uno indepen-

dientemente H; alquilo C_{1-6} ; cicloalquilo C_{3-7} ; alcoxi C_{1-6} ; cicloalcoxi C_{3-7} ; halo-alcoxi C_{1-6} ; halo-alquilo C_{1-6} ; ciano; halo; hidroxilo; alcanoflo C_{1-6} ; mono o di-alquil (C_{1-6})-amina; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amina; mono o di-alquil C_{1-6} -amida; mono o di-cicloalquil (C_{3-7})-amida; carboxilo; arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con Het; alquilarilo C_{7-14} ; ariloxi C_{6-10} ; o Het; dichos R_2 a R_4 opcionalmente unidos al grupo isoquinolina mediante un grupo enlazador alquilo C_{1-3} ; R_5 y R_6 son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-3} ; cicloalquilo C_{3-4} ; alcoxi C_{1-3} ; cicloalcoxi C_{3-4} ; halo-alcoxi C_{1-3} ; halo-alquilo C_{1-3} ; ciano; halo; hidroxilo; alcanoflo C_{1-3} ; mono o di-alquil (C_{1-3})-amina; mono o di-cicloalquil (C_{3-4})-amina; mono o di-alquil C_{1-3} -amida; mono o di-cicloalquil (C_{3-4})-amida; o carboxilo;

(b) R_7 es NH_2 o $-NR_{10}R_{11}$; donde R_{10} es alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , $C(O)-NR_{12}R_{13}$, $C(O)-OR_{14}$ o $-C(O)-R_{16}$; R_{11} es H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} , con la condición de que si R_{12} o R_{13} es H entonces R_{11} sea H; R_{12} y R_{13} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilcicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; y donde R_{12} y R_{13} junto con el nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo de 4-7 miembros; R_{14} y R_{15} son cada uno independientemente alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilcicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; R_{16} es H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o alquilcicloalquilo C_{4-10} , cada uno opcionalmente sustituido con halo, alcoxi C_{1-3} , haloalcoxi C_{1-3} , alquilo C_{1-3} o haloalquilo C_{1-3} ; arilo o Het;

(c) R_8 y R_9 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con halo, o alcoxi C_{1-3} o haloalcoxi C_{1-3} ,

(d) Q es una cadena C_{3-9} saturada o insaturada que contiene opcionalmente de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{1-6} , $-C(O)-R_{18}$, $C(O)-OR_{19}$, $C(O)-NR_{20}R_{21}$ o $-SO_2R_{22}$; R_{18} , R_{20} y R_{21} son cada uno independientemente H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} ; R_{19} es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} ; R_{22} es arilo, alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} , cada uno opcionalmente sustituido con halo; y

(e) W es OH , $-NH-SO_n-R_{23}$ o $NH-SO_n-R_{24}$, donde n es 1 ó 2, R_{23} es cicloalquilo C_{3-7} sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C_{7-9} -arilo o alquilo C_{1-4} ; y R_{24} es arilo C_{6-10} o Het;

o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

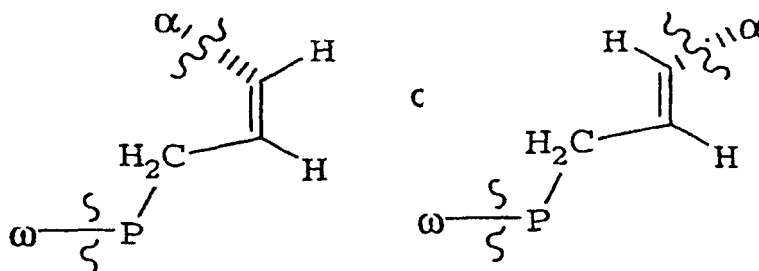
9. El compuesto de la reivindicación 8 en el que R_1 es H; alcoxi C_{1-3} ; mono o di-alquil (C_{1-6})-amina; un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros; o arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros.

10. El compuesto de la reivindicación 8 en el que R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno independientemente H; alcoxi C_{1-6} ; halo-alcoxi C_{1-6} ; hidroxilo; o mono o di-alquil (C_{1-6})-amina.

11. El compuesto de la reivindicación 8 en el que R_7 es NH_2 o NHR_{10} ; donde R_{10} es $C(O)-N R_{12}R_{13}$ o $C(O)-OR_{14}$; y R_{12} y R_{13} son alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con halo; y R_{14} es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{3-7} opcionalmente sustituido con halo.

12. El compuesto de la reivindicación 8 en el que Q es una cadena de C_{5-7} miembros que tiene un doble enlace que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} .

13. El compuesto de la reivindicación 8 en el que Q tiene la siguiente estructura:



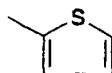
en la que P es una cadena saturada C_3 que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} .

14. El compuesto de la reivindicación 8 en el que W es $-NH-SO_n-R_{23}$, en la que n es 1 ó 2 y R_{23} es cicloalquilo C_{3-7} sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C_{7-9} -arilo o alquilo C_{1-4} .

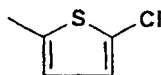
15. El compuesto de la reivindicación 8 en el que W es NH-SO_n-R₂₄, en la que n es 1 ó 2 y R₂₄ es Het.

16. El compuesto de la reivindicación 15 en el que dicho Het se selecciona entre el grupo constituido por:

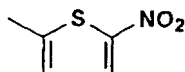
5



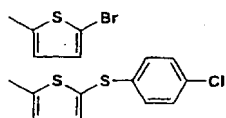
10



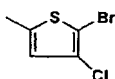
15



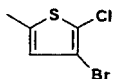
20



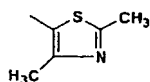
25



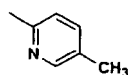
30



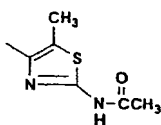
35



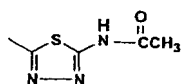
40



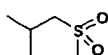
45



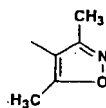
50



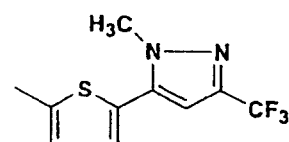
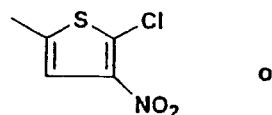
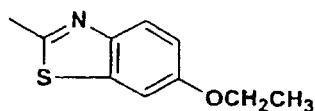
55



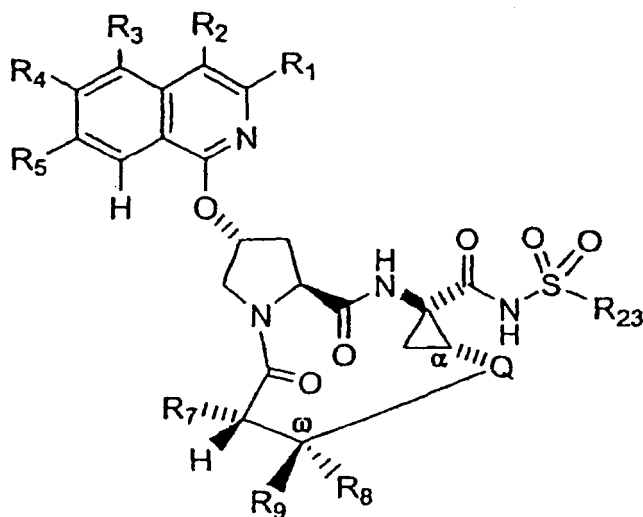
60



65



17. Un compuesto de fórmula III:



III

en la que:

- (a) R_1 es H; alcoxi C_{1-3} ; di-alquil (C_{1-6})-amina; un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros; o arilo C_{6-10} opcionalmente sustituido con un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros;
 R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno independientemente H; alcoxi C_{1-3} ; halo; o di-alquil (C_{1-6})-amina;
- (b) R_7 es $-NHR_{10}$; donde R_{10} es $C(O)-NHR_{13}$ o $C(O)-OR_{14}$; R_{13} y R_{14} son alquilo C_{1-6} ;
- (c) Q es una cadena de C_{5-7} miembros que tiene un doble enlace que contiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, $S(O)_m$; donde m es 0, 1 ó 2 o NR_{17} , donde R_{17} es H; alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{1-6} ; y
- (d) R_{23} es cicloalquilo C_{3-7} sin sustituir, o ciclopropilo o ciclobutilo opcionalmente sustituido con alquil C_{7-9} -arilo o alquilo C_{1-4} ;

o un enantiómero, diastereómero, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

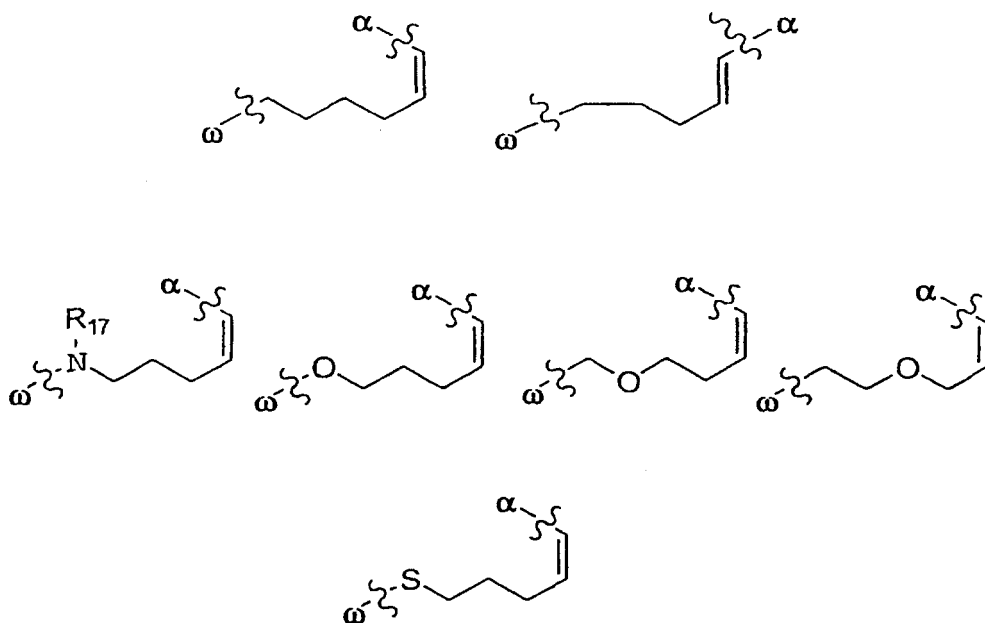
18. El compuesto de la reivindicación 17 en el que R_1 se selecciona entre el grupo constituido por piridina, morfina, piperazina, oxazol, isoxazol, tiazol, imidazol, pirrol y pirazol.

20. El compuesto de la reivindicación 17 en el que R₁ es di-alquil (C₁₋₃)-amina.

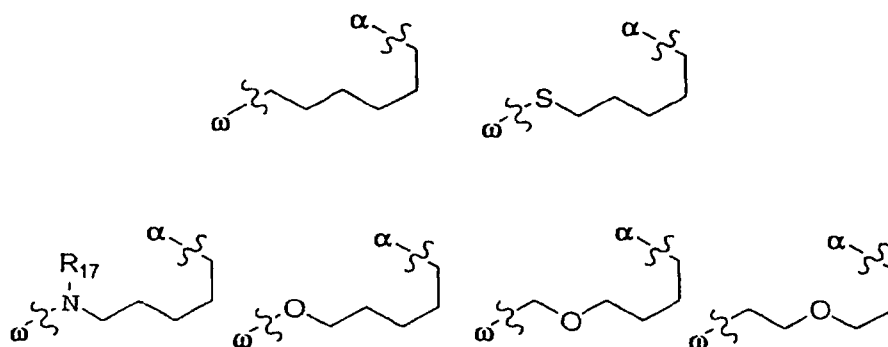
22. El compuesto de la reivindicación 17 en el que R₂ es cloro o fluro.

23. El compuesto de la reivindicación 17 en el que R₂ es di-alquil (C₁₋₃)-amina o metoxi.

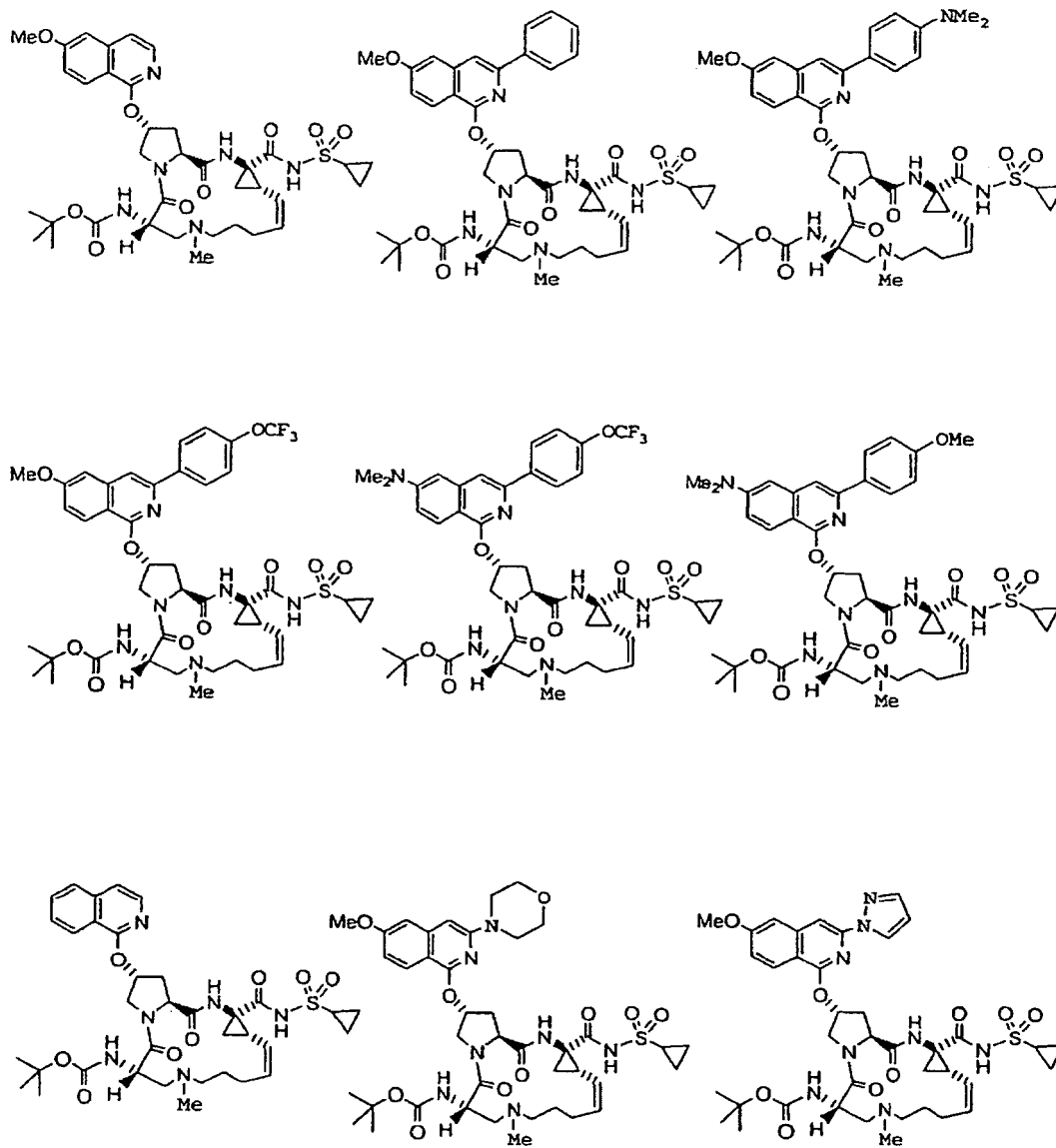
24. El compuesto de la reivindicación 17 en el que Q tiene una estructura seleccionada entre las siguientes:

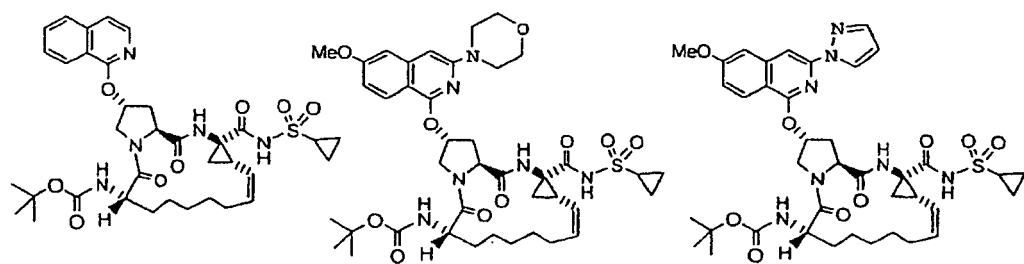
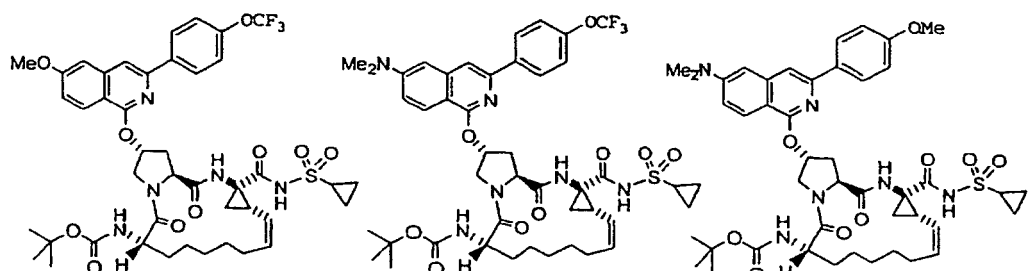
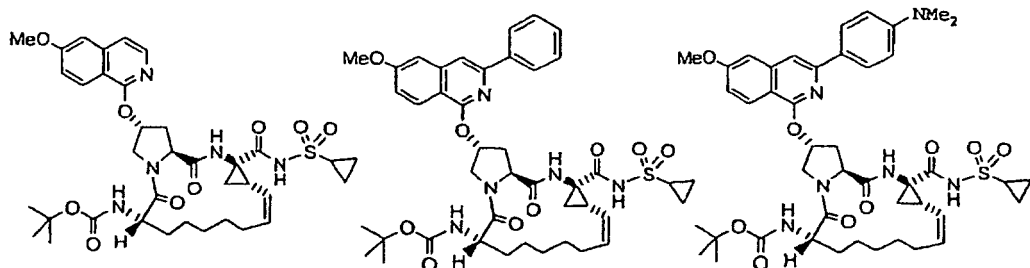
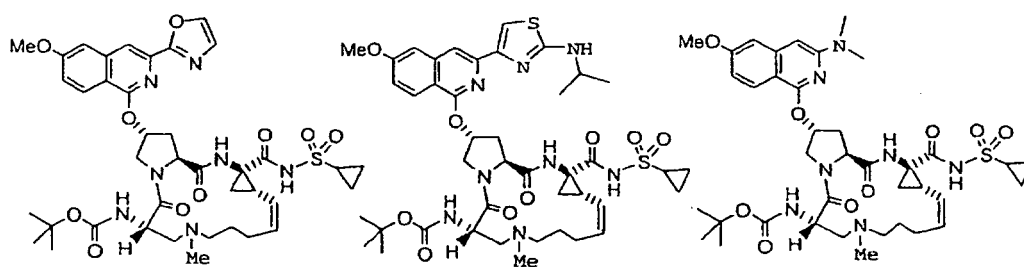


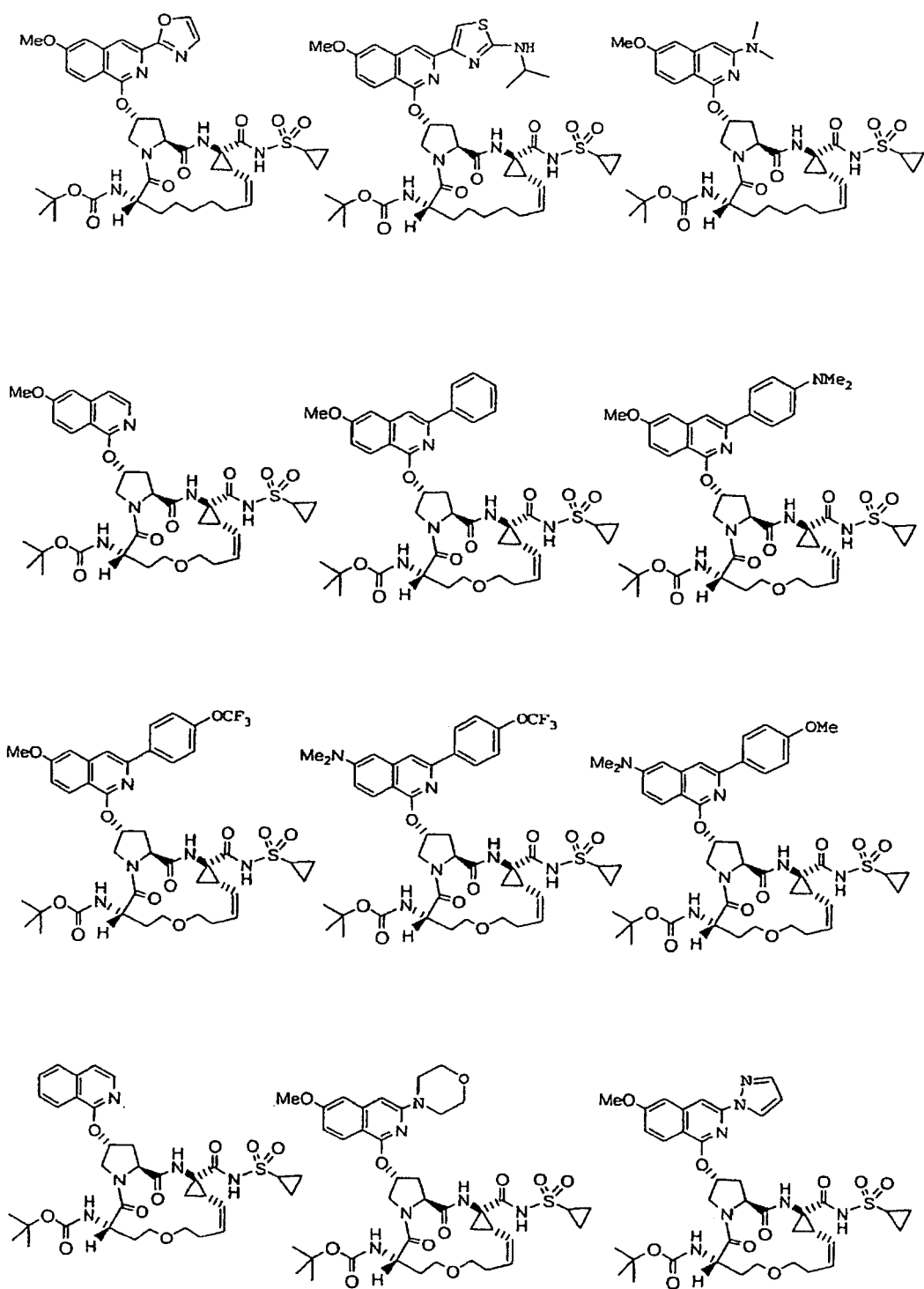
25. El compuesto de la reivindicación 17 en el que Q tiene una estructura seleccionada entre las siguientes:

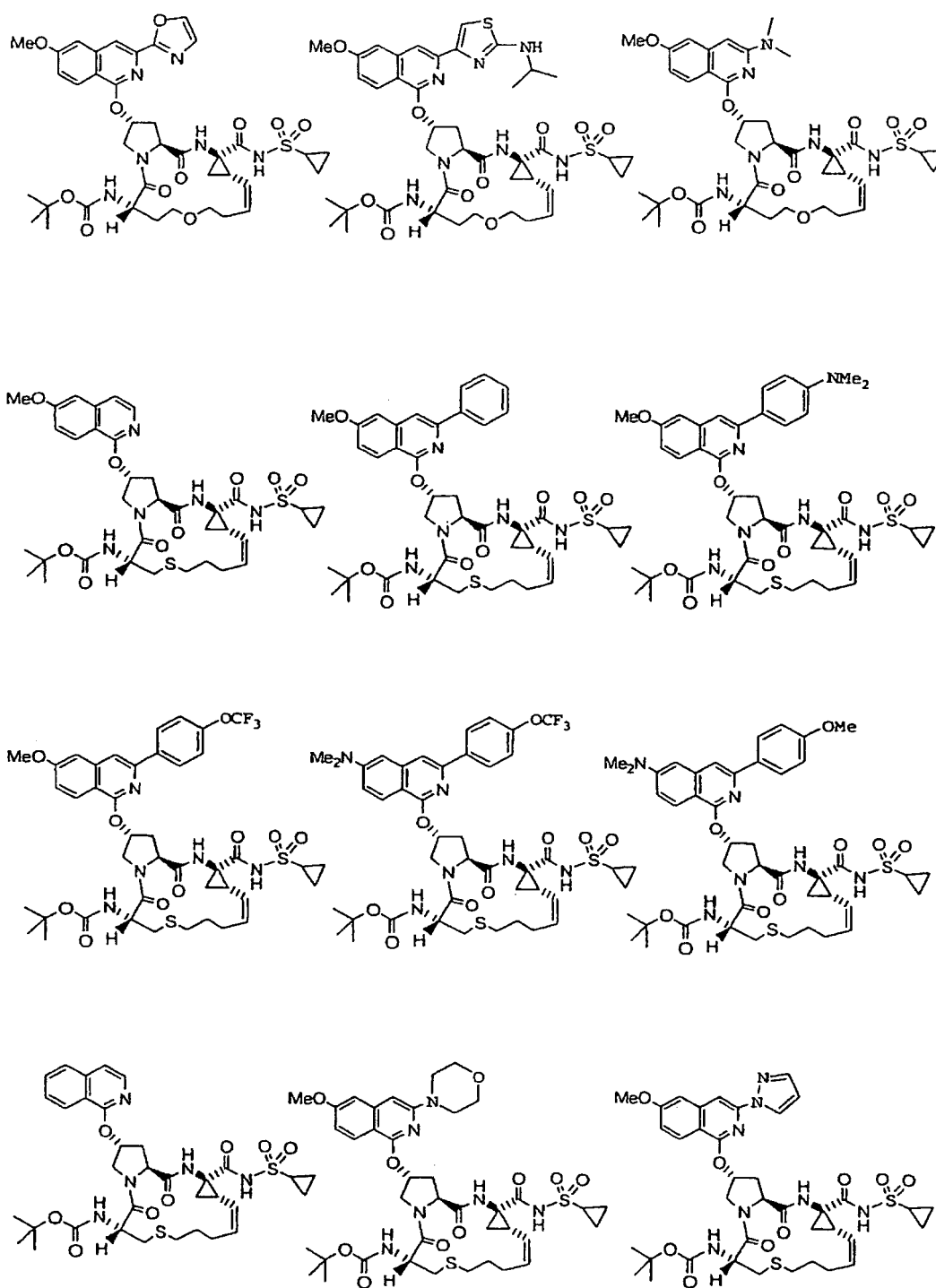


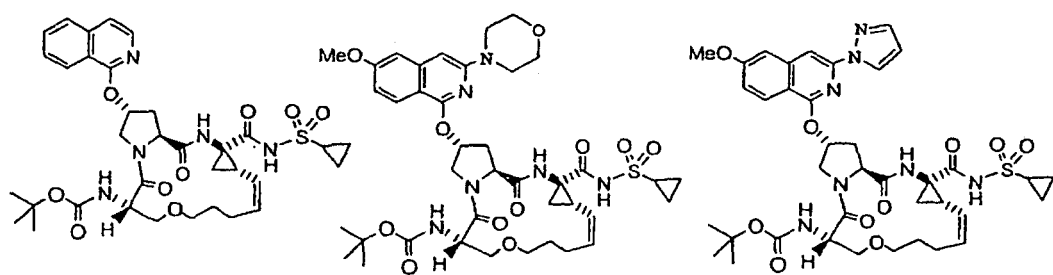
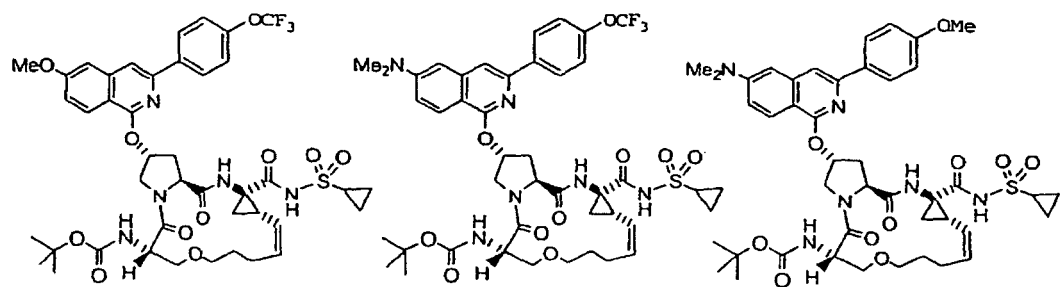
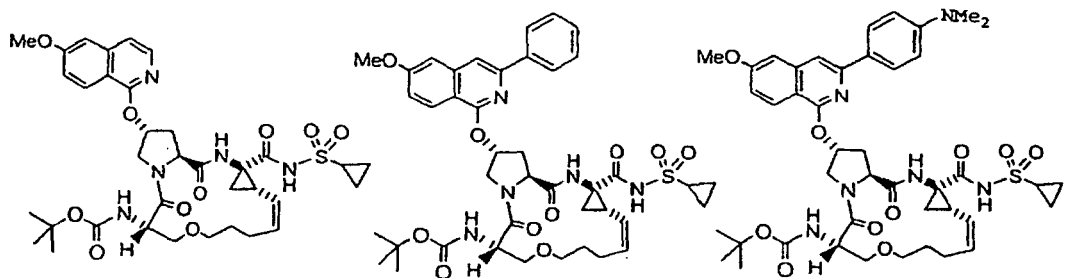
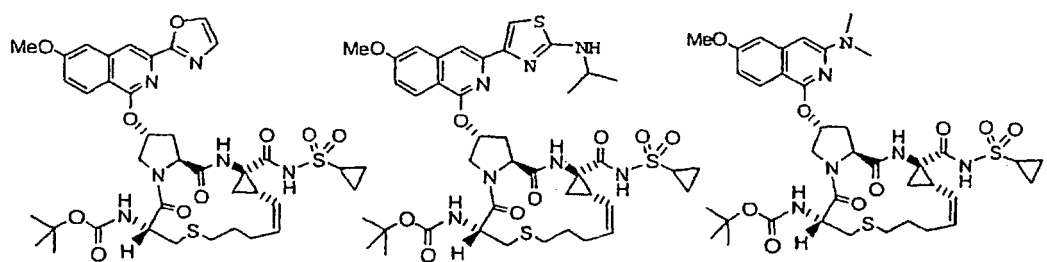
26. Un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por

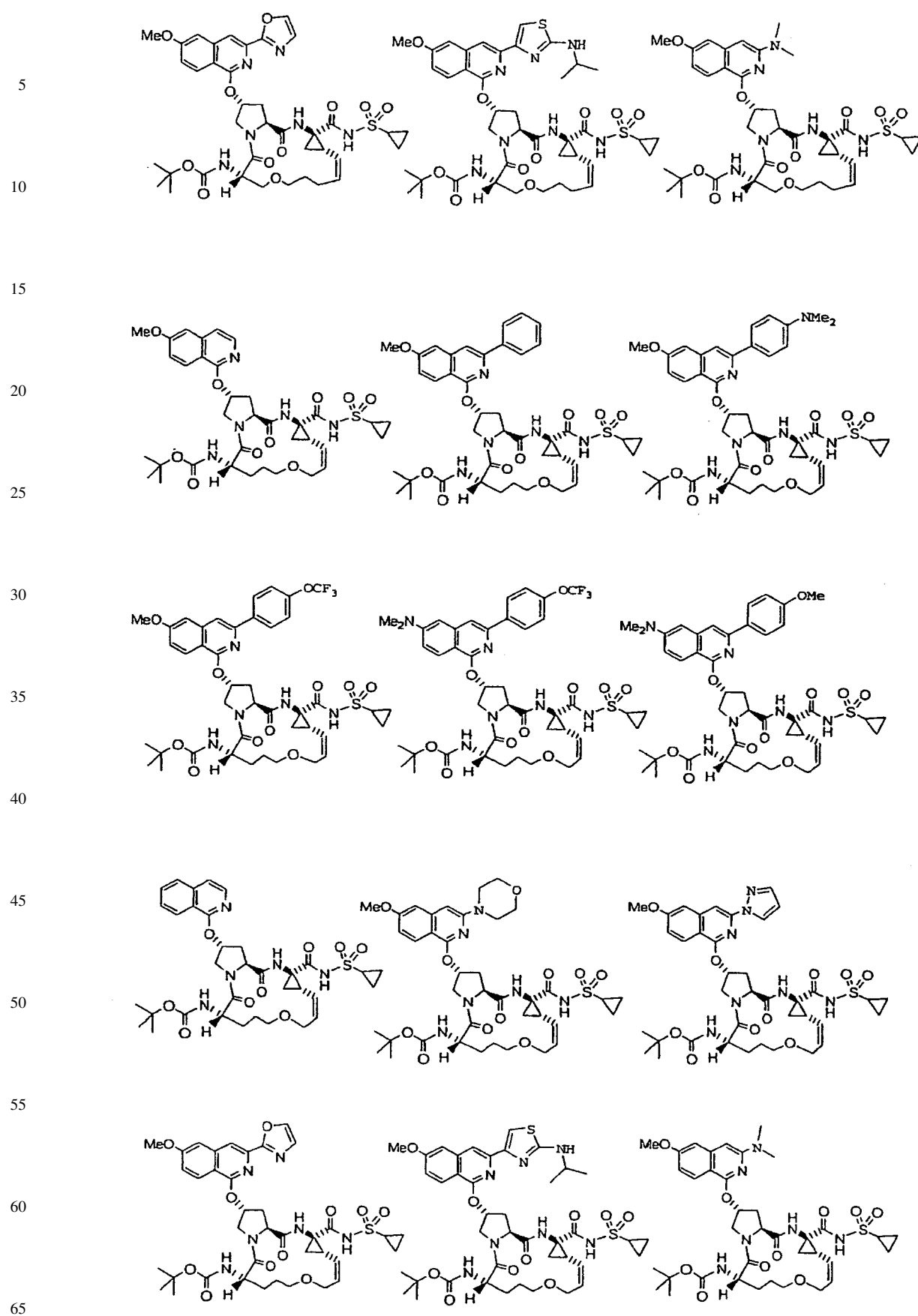












27. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27 que comprende adicionalmente un compuesto que tiene una actividad anti-HCV.

29. La composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la que el compuesto que tiene actividad anti-HCV es un interferón.

30. La composición de acuerdo con la reivindicación 29 en la que el interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la que el compuesto que tiene actividad anti-HCV se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T ayudantes tipo 1, ARN interfiriente, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 28 que comprende adicionalmente un interferón y ribavirina.

33. La composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la que el compuesto que tiene actividad anti-HCV es un compuesto de moléculas pequeñas.

34. La composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la que el compuesto que tiene actividad anti-HCV es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre el grupo constituido por metaloproteasa de HCV, serina proteasa de HCV, polimerasa de HCV, helicasa de HCV, proteína NS4B de HCV, entrada de HCV, ensamblaje de HCV, salida de HCV, proteína NS5A de HCV, IMPDH y un análogo de nucleósido para el tratamiento de una infección por HCV.

35. Un procedimiento para inhibir la función de la serina proteasa de HCV *in vitro* que comprende poner en contacto la serina proteasa de HCV con el compuesto de la reivindicación 1.

36. Uso en la preparación de un medicamento para tratar una infección por HCV en un paciente, del compuesto de la reivindicación 1, o un enantiómero, diastereómero, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

37. El uso de acuerdo con la reivindicación 36 en el que el compuesto es eficaz para inhibir la función de la serina proteasa de HCV.

38. El uso de acuerdo con la reivindicación 36 que comprende adicionalmente administrar otro compuesto que tiene actividad anti-HCV antes de, después de o a la vez que el compuesto de la reivindicación 1.

39. El uso de acuerdo con la reivindicación 38 en el que el otro compuesto que tiene actividad anti-HCV es un interferón.

40. El uso de acuerdo con la reivindicación 39 en el que el interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A, interferón tau linfoblastoide.

41. El uso de acuerdo con la reivindicación 38 en el que el otro compuesto que tiene actividad anti-HCV se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T ayudantes de tipo 1, ARN interfiriente, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

42. El uso de acuerdo con la reivindicación 38 en el que el compuesto que tiene actividad anti-HCV es una molécula pequeña.

43. El uso de acuerdo con la reivindicación 42 en el que el compuesto que tiene actividad anti-HCV es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre el grupo constituido por metaloproteasa de HCV, serina proteasa de HCV, polimerasa de HCV, helicasa de HCV, proteína NS4B de HCV, entrada de HCV, ensamblaje de HCV, salida de HCV, proteína NS5A de HCV, IMPDH y un análogo de nucleósido para el tratamiento de una infección por HCV.

44. El uso de acuerdo con la reivindicación 38 en el que el otro compuesto que tiene actividad anti-HCV es eficaz para inhibir la función de una diana en el ciclo de vida del HCV distinta de la serina proteasa de HCV.

45. Uso de la composición de la reivindicación 27 para la fabricación de un medicamento para tratar una infección por HCV en un paciente.