



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20040689 A2

HR P20040689 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: C 07 K 5/08
A 61 K 38/06
A 61 P 31/14

(21) Broj prijave u HR: P20040689A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 29.07.2004.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/CA03/000089
Datum podnošenja međunarodne prijave 24.01.2003.
(87) Broj međunarodne objave: WO 03/064455
Datum međunarodne objave 07.08.2003.

(31) Broj prve prijave: 2,369,711

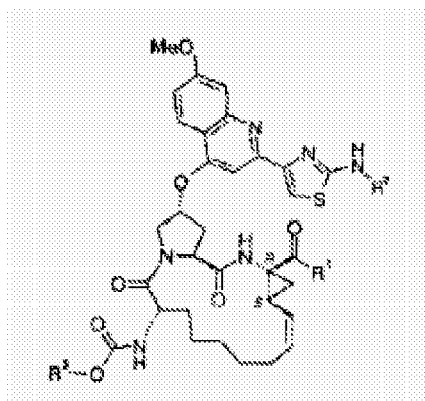
(32) Datum podnošenja prve prijave: 30.01.2002.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: CA

(71) Podnositelj prijave: Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., 2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA
(72) Izumitelji: Montse Llinas-Brunet, 14 Rushbrooke, Dolard-des-Ormeaux, Québec H9B 3K6, CA
Vida J. Gorys, 114 Montevista, Dolard-des-Ormeaux, Québec H9B 2Z9, CA
(74) Punomoćnik: CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: **MAKROCIKLIČKI PEPTIDI AKTIVNI PROTIV HEPATITIS C VIRUSA**

(57) Sažetak: Spojevi formule I:



u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $\{(C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil $\}$, od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, O- (C_{1-6}) alkilom, amido, amino ili fenilom, ili R^{1A} predstavlja C_6 ili C_{10} aril po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, (C_{1-6}) alkilom, O- (C_{1-6}) alkilom, amido, amino ili fenilom; R^2 predstavlja (C_{5-6}) cikloalkil, a R^3 predstavlja ciklopentil; ili njihove farmaceutski prihvatljive soli, a koriste se kao inhibitori HCV NS3 proteaze.

HR P20040689 A2

OPIS IZUMA**Područje izuma**

- 5 Prikazani izum se odnosi na spojeve, postupke njihove sinteze, pripravke i metode liječenja infekcije virusom hepatitisa C (HCV). Osobito se prikazani izum odnosi na nove analoge peptida, farmaceutske pripravke koji ih sadrže i postupke primjene navedenih analoga u liječenju infekcije hepatitisa C virusa (HCV).

Pozadina izuma

- 10 Virus hepatitisa C (HCV) je glavni etiološki agens post-transfuzijskog i stečenog non-A non-B hepatitisa u svijetu. Procjenjuje se da je preko 200 miliona ljudi u svijetu zaraženo virusom. Visok je postotak nosioca koji su kronično inficirani, a bolest uglavnom progredira u kroničnu bolest jetre, odnosno kronični hepatitis C. Navedena je skupina bolesnika pod velikim rizikom za razvoj teške bolesti jetre kao što su ciroza jetre, hepatocelularni karcinom i terminalna
15 bolest jetre koja dovodi do smrti.

- Način na koji HCV perzistira i uzrokuje visok stupanj kronične bolesti jetre, još nije u potpunosti rasvijetljen. Nije poznato kako HCV ulazi u interakciju i napada ljudski imunološki sustav. Pored toga, uloga stanične i humoralne imunosti u zaštiti protiv HCV infekcije i bolesti još nije točno utvrđena. Imunoglobulini djeluju profilaktički kod
20 transfuzijom prenesenog virusnog hepatitisa, premda, Centar za kontrolu bolesti, trenutno ne preporuča primjenu imunoglobulina u navedenoj indikaciji. Nedostatak učinkovitog zaštitnog imunološkog odgovora ometa razvoj vakcine ili adekvatnih mjera koje bi se poduzele kao profilaksa nakon izlaganja virusu, tako da su nade uglavnom položene na antivirusna djelovanja.

- 25 Različita klinička ispitivanja su sprovedena sa ciljem da se identificiraju farmaceutski agensi koji bi učinkovito liječili HCV infekciju kod bolesnika oboljelih od kroničnog hepatitisa C. Navedene studije obuhvaćaju uporabu interferona-alfa, samostalno ili u kombinaciji sa drugim antivirusnim agensima. Takve studije su pokazale da značajan broj ispitanika ne pokazuje terapijski odgovor, a od onih koji su pozitivno reagirali, veliki dio je dobio relaps nakon završetka liječenja.

- 30 Donedavno, interferon (IFN) je bio jedina dostupna terapija dokazane učinkovitosti, odobrena od strane kliničara za liječenje bolesnika sa kroničnim hepatitisom C. Premda, je produženi odgovor bolesnika na terapiju nizak, a terapija interferonom uzrokuje ozbiljne nuspojave (npr. retinopatija, tiroiditis, akutni pankreatitis, depresija) koji smanjuju kvalitetu života bolesnika. Nedavno je odobrena kombinacija interferona i ribavirina za bolesnike koji nisu reagirali na monoterapiju IFN. Unatoč tome, nuspojave uzrokovane IFN nisu smanjene kombiniranom terapijom. Pegilirani oblici
35 interferona kao što su PEG-Intron® i Pegasys® navodno djelomično smanjuju navedene pogubne nuspojave, no antivirusni lijekovi još uvijek ostaju glavni izbor u peroralnom liječenju HCV.

- Zbog toga, postoji potreba razvoja učinkovitih antivirusnih agensa za liječenje infekcije HCV, a koji će riješiti ograničenja postojeće farmaceutske terapije.

- 40 HCV je RNA virus s ovojnicom iz obitelji Flaviviridae. Genom jednolančane HCV RNA približno je dužine od 9500 nukleotida i sadrži jednostruku otvorenu sekvencu za očitavanje (ORF) koja kodira jedan veliki poliprotein od približno 3000 amino kiselina. U zaraženim stanicama, poliprotein se cijepa na mnogim mjestima staničnim i virusnim proteazama i proizvodi strukturne i nestrukturne (NS) proteine. U slučaju HCV, generacija zrelih nestrukturnih proteina (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) je zahvaćena djelovanjem dviju virusnih proteaza. Prva, koja je još uvijek
45 slabo poznata, cijepa NS2-NS3 spoj (zbog toga je nazvana NS2/3 proteaza); druga, predstavlja serinsku proteazu koja je sadržana u N-terminalnoj regiji NS3 (NS3 proteaza) i sudjeluje u svim daljnjim cijepanjima nizvodno od NS3, u *cis*, na mjestu cijepanja NS3-NS4A, a u *trans* obliku, na preostalom NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B mjestima. NS4A protein ima mnogostruke funkcije, djeluje kao kofaktor za NS3 proteazu i moguće je da pomaže u membranskoj lokalizaciji NS3 i drugih komponenti virusne replikaze. Stvaranje kompleksa NS3 proteaze sa NS4A čini se
50 neophodnim u odvijanju događaja, odnosno pojačavanju proteolitičkog djelovanja na svim mjestima. NS3 protein isto tako inhibira aktivnost nukleozidne trifosfataze i RNA helikaze. NS5B predstavlja RNA-ovisnu RNA polimerazu koja sudjeluje u replikaciji HCV.

- 55 Opća strategija u razvoju antivirusnih lijekova predstavlja inaktivaciju virusom kodiranih enzima koji su ključni u replikaciji virusa.

- Slijedi popis patentnih prijava objavljenih zadnjih nekoliko godina, a koji otkrivaju peptidne analoge inhibitora HCV NS3 proteaze, strukturno različite od spojeva prikazanog izuma:

- 60 GB 2,337,262; JP 10298151; JP 11126861; JP 11292840; JP 2001-103993; US 6,159,938; US 6,187,905; WO 97/43310; WO 98/17679; WO 98/22496; WO 98/46597; WO 98/46630; WO 99/38888; WO 99/50230; WO 99/64442; WO 99/07733; WO 99/07734; WO 00/09543; WO 00/09558; WO 00/20400; WO 00/59929; WO 00/31129; WO 01/02424;

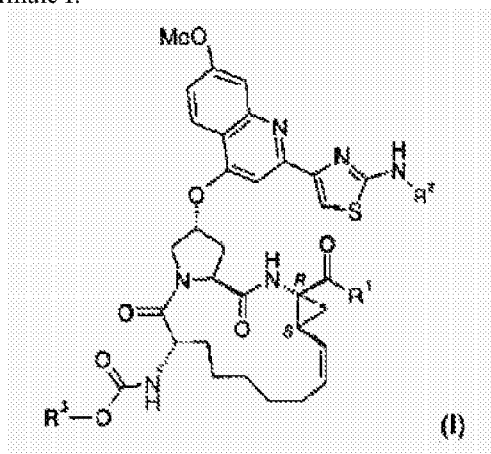
WO 01/07407; WO 01/16357; WO 01/32691; WO 01/40262; WO 01/58929; WO 01/64678; WO 01/74768; WO 01/77113; WO 01/81325; WO 02/08187; WO 02/08198; WO 02/08244; WO 02/08251; WO 02/08256; WO 02/18369; WO 02/60926 i WO 02/79234.

- 5 Spojevi prikazanog izuma se razlikuju po drugačijoj kemijskoj strukturi i po iznenađujućem saznanju da specifično inhibiraju HCV NS3 proteazu, istovremeno neznatno inhibirajući druge serinske proteaze. Nadalje, spojevi su aktivni u staničnoj kulturi i imaju iznenađujuće dobar farmakokinetički profil *in vivo*.

Sažetak izuma

10

U doseg izuma pripadaju spojevi formule I:



- 15 u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $((C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil), od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, O- (C_{1-6}) alkilom, amido, amino ili fenilom, ili R^{1A} predstavlja C_6 ili C_{10} aril po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, (C_{1-6}) alkilom, O- (C_{1-6}) alkilom, amido, amino ili fenilom; R^2 predstavlja (C_{5-6}) cikloalkil, a R^3 predstavlja ciklopentil; ili njihove farmaceutski prihvatljive soli.

- 20 U doseg izuma pripada farmaceutski pripravak koji sadrži anti-hepatitis C virusno učinkovitu količinu spoja formule I, ili njegovu terapijski učinkovitu sol, u smjesi sa farmaceutski prihvatljivim nosačem ili pomoćnim sredstvom.

- U skladu s jednim ostvarenjem izuma, izumom su obuhvaćeni drugi farmaceutski preparati kao što su interferon (pegilirani ili ne), ili ribavirin, ili jedan ili više drugih anti-HCV agensa, ili bilo koja kombinacija prethodno navedenih sredstava.

- 25 Drugi važan aspekt izuma obuhvaća postupak liječenja infekcije hepatitis C virusom kod sisavaca primjenom anti-hepatitis C virusno učinkovite količine spoja formule I, njegove terapijski prihvatljive soli, ili pripravka u skladu s prethodno navedenim opisom, pojedinačno ili u kombinaciji s jednim ili više slijedećih agensa: interferon (pegilirani ili ne), ili ribavirin, ili jedan ili više drugih anti-HCV agensa, a od kojih se svi mogu primjenjivati zajedno ili svaki posebno.

- 30 Drugi važan aspekt prikazanog izuma obuhvaća postupak prevencije infekcije virusom hepatitisa C kod sisavaca primjenom anti-hepatitis C virusno učinkovite količine spoja formule I, njihove terapijski prihvatljive soli, ili pripravka u skladu s prethodno navedenim opisom, samostalno ili u kombinaciji s jednim ili više slijedećih agensa: interferon (pegilirani ili ne), ili ribavirin, ili jedan ili više drugih anti-HCV agensa, a od kojih se svi mogu primjenjivati zajedno ili svaki posebno.

- Isto tako u doseg izuma pripada uporaba spojeva formule I, u skladu s navedenim opisom, za proizvodnju lijeka za liječenje ili prevenciju infekcije hepatitis C virusom.

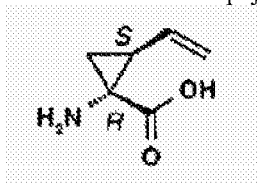
40

Detaljan opis prikladnih ostvarenja**Definicije**

- 5 Kao što se ovdje koristi, primjenjene su slijedeće definicije, ako nije drugačije naglašeno:
U slučajevima kada se koristi (R) ili (S) kako bi se obilježila apsolutna konfiguracija asimetričnog centra, oznaka se nalazi u kontekstu cijelog spoja, a ne samo u kontekstu supstituenta.

- Oznaka «P1, P2 i P3» kao što je ovdje korišteno, odnosi se na položaj amino kiselnog ostatka počevši od C-završetka peptidnih analoga i šireći se prema N-završetku (tj. P1 se odnosi na položaj 1 počevši od C-završetka, P2: je drugi položaj od C-završetka, itd.) (vidi Berger A. S Schechter I., Transakcija londonskog kraljevskog društva serija B257, 249-264 (1970)).

Kao što se ovdje koristi, naziv «(1R,2S)-vinil-ACCA» se odnosi na spoj formule:



- 15 pod nazivom, (1R,2S) 1-amino-2-etenilciklopropilkarboksilnu kiselinu.

Naziv «halo» označava halogeni supstituent odabran između bromo, kloro, fluoro i jodo.

- 20 Naziv «(C₁₋₆)alkil» ili «(niži)alkil», sam ili u kombinaciji sa drugim supstituentom, označava aciklički, ravni ili razgranati lanac alkilnih supstituenata koji sadrže od 1 do 6 atoma ugljika, a obuhvaća, na primjer, metil, etil, propil, butil, heksil, 1-metiletil, 1-metilpropil, 2-metilpropil i 1,1-dimetiletil.

- 25 Naziv «(C₁₋₈)alkil», sam ili u kombinaciji sa drugim supstituentom, označava aciklički, ravni ili razgranati lanac alkilnih supstituenata koji sadrže od 1 do 8 atoma ugljika, a obuhvaća, na primjer, metil, etil, 2,2-dimetilbutil, heksil, 1-metilheksil, heptil i oktil.

- 30 Naziv «(C₃₋₇)cikloalkil», sam ili u kombinaciji sa drugim supstituentom, označava cikloalkilni supstituent koji sadrži od tri do sedam atoma ugljika, a obuhvaća ciklopropil, ciklobutil, ciklopentil, cikloheksil i cikloheptil.

- 35 Naziv «((C₁₋₆)alkil-(C₃₋₇)cikloalkil)», označava cikloalkilni radikal koji sadrži od 3 do 7 atoma ugljika, izravno vezanih na alkilenski radikal koji sadrži od 1 do 6 atoma ugljika; na primjer, ciklopropilmetil, ciklopentiletil, cikloheksilmetil, cikloheksiletil, te cikloheptilpropil. U slučaju kada R^{3A} predstavlja {(C₁₋₆)alkil-(C₃₋₇)cikloalkil}, navedena je skupina vezana na SO₂ skupinu putem (C₁₋₆)alkila (tj. alkilenskog dijela).

- Naziv «O-(C₁₋₆)alkil», sam ili u kombinaciji sa drugim supstituentom, označava supstituent -O-(C₁₋₆)alkil u kojem je alkil u skladu s prethodno navedenom definicijom, a sadrži do šest atoma ugljika. O-(C₁₋₆)alkil obuhvaća obuhvaća metoksi, etoksi, propoksi, 1-metiletoksi, butoksi i 1,1-dimetiletoksi. Zadnji je supstituent poznat kao terc-butoksi.

- 40 Naziv «farmaceutski prihvatljiva sol» označava sol spoja formule I, a koja pripada doseg ispravne medicinske procjene i prikladna je za primjenu u kontaktu sa tkivom čovjeka i nižih životinja, bez neželjene toksičnosti, iritacije, alergijskog odgovora i slično, omjer dobrobiti i koristi je pozitivan, općenito je u vodi ili ulju topljiva i učinkovita u željenoj indikaciji. Naziv obuhvaća farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli i farmaceutski prihvatljive bazične adicijske soli. Popis prikladnih spojeva, može se naći, npr. u S.M. Birge i sur., J. Pharm. Sci., 1977,66, str. 1 do 19, koji je u cijelosti obuhvaćen referencom.

- 50 Naziv «farmaceutski prihvatljiva kiselinska adicijska sol» označava navedene soli koje zadržavaju biološku učinkovitost i svojstva slobodnih baza, a koje nisu biološki ili na neki drugi način nepoželjne, a nastale su iz anorganskih kiselina kao što su klorovodična kiselina, bromovodična kiselina, jodovodična kiselina, sumporna kiselina, sulfatna kiselina, nitratna kiselina, fosfatna kiselina i slično, te organskih kiselina kao što su octena kiselina, triklorooctena kiselina, trifluorooctena kiselina, adipinska kiselina, algininska kiselina, askorbinska kiselina, aspartatna kiselina, benzensulfonska kiselina, benzojeva kiselina, 2-acetoksibenzojeva kiselina, maslačna kiselina, kamforna kiselina, kamforsulfonska kiselina, cimetna kiselina, limunska kiselina, diglukonska kiselina, etansulfonska kiselina, glutamatna kiselina, glikolna kiselina, glicerofosforna kiselina, hemisulfinska kiselina, heptanonska kiselina, heksanonska kiselina, mravlja kiselina, fumarinska kiselina, 2-hidroksietansulfonska kiselina (izetionska kiselina), mliječna kiselina, maleinska kiselina, hidroksimaleinska kiselina, jabučna kiselina, malonska kiselina, bademova kiselina, metilensulfonska kiselina, metansulfonska kiselina, naftalensulfonska kiselina, nikotinska kiselina, 2-naftalensulfonska

kiselina, oksalatna kiselina, paminska kiselina, pektinska kiselina, feniloctena kiselina, 3-fenilpropionska kiselina, pikrinska kiselina, pivalinska kiselina, propionska kiselina, piruvatna kiselina, salicilna kiselina, stearinska kiselina, jantarna kiselina, sulfanilska kiselina, vinska kiselina, p-toluensulfonska kiselina, undekanonska kiselina i slično.

- 5 Naziv «farmaceutski prihvatljive bazične adicijske soli» označava soli koje zadržavaju biološku učinkovitost i svojstva slobodnih kiselina, a koje nisu biološki ili na neki drugi način nepoželjne, a nastale su iz anorganskih baza kao što su natrij, kalij, litij, kalcij, magnezij, željezo, cink, bakar, mangan, aluminij i slično. Osobito su prikladne amonijeve, kalijeve, natrijeve, kalcijeve i magnezijeve soli. Soli porijeklom iz farmaceutski prihvatljivih organskih netoksičnih baza obuhvaćaju soli primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina, spojevi kvaternih amina, supstituirani amini uključujući prirodno supstituirane amine, cikličke amine i bazične smole ionske izmjenjivače, kao što su metilamin, dimetilamin, trimetilamin, etilamin, dietilamin, trietilamin, izopropilamin, tripropilamin, tributilamin, etanolamin, dietanolamin, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicikloheksilamin, lizin, arginin, histidin, kafein, hidrarginin, kolin, betain, etilendiamin, glukozamin, metilglukamin, teobrom, purini, piperazin, piperidin, N-etilpiperidin, tetrametilamonijevi spojevi, tetraetilamonijevi spojevi, piridin, N,N-dimetilanilin, N-metilpiperidin, N-metilmorfolin, dicikloheksilamin, dibenzilamin, N,N-dibenzilfenetilamin, 1-efenamin, N,N'-dibenziletiletilendiamin, poliaminske smole i slično. Osobito prikladne organske netoksične baze su izopropilamin, dietilamin, etanolamin, trimetilamin, dicikloheksilamin, kolin i kafein.

- 20 Naziv «antivirusno sredstvo» označava agens (spoj ili biološki agens) koji učinkovito inhibira stvaranje i/ili replikaciju virusa kod sisavaca. Navedeno uključuje agense koji utječu na mehanizme, domaćina ili virusa, neophodne za stvaranje i/ili replikaciju virusa kod sisavaca. Antivirusna sredstva obuhvaćaju, na primjer, ribavirin, amantadin, VX-497 (merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), Levovirin, Viramidine, Ceplene (maxamine), XTL-001 i XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals).

- 25 Naziv pored anti-HCV agensa označava agense učinkovite u smanjenju progresije ili prevenciji simptoma bolesti povezanih sa hepatitisom C. Navedeni se agensi mogu odabrati između: imunomodulatora, inhibitora HCV NS3 proteaze, inhibitora HCV polimeraze ili inhibitora drugih ključnih točaka u životnom ciklusu HCV.

- 30 Naziv «imunomodulator» označava sredstva (spojeve ili biološke agense) koja učinkovito pojačavaju ili pospješuju odgovor imunološkog sustava sisavaca. Imunomodulatori obuhvaćaju, na primjer, razred I interferona (kao što su α -, β -, γ - i omega interferoni, tau-interferoni, konsenzus interferoni i asialo-interferoni), razred II interferona (kao što su γ -interferoni) i pegilirane interferone.

- 35 Naziv «inhibitor HCV NS3 proteaze» označava sredstvo (spoj ili biološki agens) koje učinkovito inhibira funkciju HCV NS3 proteaze kod sisavaca. Inhibitori HCV NS3 proteaze obuhvaćaju, na primjer, spojeve opisane u WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09558, WO 00/09543, WO 00/59929 ili WO 02/060926, Boehringer Ingelheim klinički kandidat identificiran kao BILN 2061 i Vertex/Eli Lilly predrasvojni kandidat identificiran kao VX-950 ili LY-570310. Osobito se mogu koristiti, spojevi #2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 18, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 55, 59, 71, 91, 103, 104, 105, 112, 113, 114, 115, 116, 120, 122, 123, 124, 125, 126 i 127, prikazani u tabeli na stranicama 224-226 u WO 02/060926, u kombinaciji sa spojevima prikazanog izuma.

- Naziv «inhibitor HCV polimeraze» označava sredstvo (spoj ili biološki agens) koje učinkovito inhibira funkciju HCV polimeraze kod sisavaca. Navedeno obuhvaća, na primjer, inhibitore HCV NS5B polimeraze. Inhibitori HCV polimeraze obuhvaćaju ne-nukleozide, na primjer, spojeve opisane u:

- 45 - US Patentnoj prijavi Br. 10/198,680, koja odgovara PCT/CA02/01127, obje podnesene 18. srpnja 2002. (Boehringer Ingelheim),
 - US Patentnoj prijavi Br. 10/198,384, koja odgovara PCT/CA02/01128, obje podnesene 18. srpnja 2002. (Boehringer Ingelheim),
 - US Patentnoj prijavi Br. 10/198,259, koja odgovara PCT/CA02/01129, obje podnesene 18. srpnja 2002. (Boehringer Ingelheim),
 50 - WO 02/100846 A1 i WO 02/100851 A2 (obje Shire),
 - WO 01/85172 A1 i WO 02/098424 A1 (obje GSK),
 - WO 00/06529 i WO 02/06246 A1 (obje Merck),
 - WO 01/47883 i WO 03/000254 (obje Japan Tobacco) i
 55 - EP 1 256 628 A2 (Agouron).

Nadalje drugi inhibitori HCV polimeraze isto tako obuhvaćaju analoge nukleozida, na primjer, spojeve opisane u:

- 60 - WO 01/90121 A2 (Idenix),
 - WO 02/069903 A2 (Biocryst Pharmaceuticals Inc.) i
 - WO 02/057287 A2 i WO 02/057425 A2 (oba Merck/Isis).

Specifični primjeri inhibitora HCV polimeraze obuhvaćaju JTK-002, JTK-003 i JTK-109 (Japan Tobacco).

- Naziv «inhibitor drugog ciljnog mjesta u životnom ciklusu HCV» označava agens (spoj ili biološko sredstvo) koji učinkovito inhibira stvaranje i/ili replikaciju HCV kod sisavaca, na drugi način, pored inhibicije HCV NS3 proteaze. Navedeno uključuje agense koji utječu na mehanizme, domaćina ili virusa, neophodne za stvaranje i/ili replikaciju virusa kod sisavaca. Inhibitori drugog važnog mjesta u životnom ciklusu HCV obuhvaćaju, na primjer, agense koji inhibiraju ciljno mjesto koje može biti helikaza, HCV NS2/3 proteaza, te unutarnje mjesto ulaska na ribosomu (IRES). Specifičan primjer inhibitora drugog ciljnog mjesta u životnom ciklusu HCV predstavlja ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals).
- 10 Naziv «HIV inhibitor» označava agens (spoj ili biološko sredstvo) koji učinkovito inhibira stvaranje i/ili replikaciju HIV kod sisavaca. Navedeno uključuje agense koji utječu na mehanizme, domaćina ili virusa, neophodne za stvaranje i/ili replikaciju HIV-a kod sisavaca. Inhibitori HIV-a obuhvaćaju, na primjer, inhibitore nukleozida, ne-nukleozidne inhibitore, inhibitore proteaze, inhibitore fuzije i inhibitore integreze.
- 15 Naziv «HAV inhibitor» označava agens (spoj ili biološko sredstvo) koje učinkovito inhibira stvaranje i/ili replikaciju HAV kod sisavaca. Navedeno uključuje agense koji utječu na mehanizme, domaćina ili virusa, neophodne za stvaranje i/ili replikaciju HAV kod sisavaca. HAV inhibitori obuhvaćaju Hepatitis A vakcine, na primjer, Havrix[®] (GlaxoSmithKline), VAQTA[®] (Merck) i Avaxim[®] (Aventis Pasteur).
- 20 Naziv «HBV inhibitor» označava agens (spoj ili biološko sredstvo) koje učinkovito inhibira stvaranje i/ili replikaciju HBV kod sisavaca. Navedeno uključuje agense koji utječu na mehanizme, domaćina ili virusa, neophodne za stvaranje i/ili replikaciju HBV kod sisavaca. Inhibitori HBV obuhvaćaju, na primjer, agense koji inhibiraju HBV virusnu DNA polimerazu ili HBV vakcine. Specifični primjeri HBV inhibitora obuhvaćaju Lamivudine (Pivir-HBV[®]), Adefovir Dipivoxil, Entecavir, FTC (Coviracil[®]), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudine[®]), AM365 (Amrad), Ldt (Telbivudine), monoval-LdC (Valtorcitabine), ACH-126,443 (L-Fd4C) (Achillion), MCC478 (Eli Lilly), Racivir (RCV), Fluoro-L i D nukleozidi, Robustafavone, ICN 2001-3 (ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001 (XTL), Imino-Šećeri (Nonyl-DNJ) (Synergy), HepBzyme; i imunomodulatorski produkti kao što su: interferon alfa 2b, HE2000 (Hollis-Eden), Theradigm (Epimmune), EHT899 (Enzo Biochem), Thymosin alpha-1 (Zadaxin[®]), HBV DNA vakcina (PowderJect), HBV DNA vakcina (Jefferson Center), HBV antigen (OraGen), BayHep B[®] (Bayer), Nabi-HB[®] (Nabi) i Anti-hepatitis B (Cangene);
- 25 i produkti HBV vakcine kao što su slijedeći: Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac.
- Naziv «interferon razreda I» označava interferon odabran iz skupine interferona od kojih se svi vežu na receptor tipa I. Navedeno uključuje prirodne i sintetski dobivene interferone razreda I. Primjeri interferona razreda I obuhvaćaju α -, β -,
- 35 omega interferone, tau-interferone, konsenzus interferone, asialo-interferone.
- Naziv «interferon razreda II» označava interferon odabran iz skupine interferona od kojih se svi vežu na receptor tipa II. Primjeri interferona razreda II obuhvaćaju γ -interferone.
- 40 Farmaceutski pripravnici izuma mogu sadržavati jedan ili više dodatnih aktivnih agensa odabranih, na primjer, između antivirusnih sredstava, imunomodulatora, drugih inhibitora HCV NS3 proteaze, inhibitora HCV polimeraze, inhibitora drugog važnog mjesta u životnom ciklusu HCV, HIV inhibitore, HAV inhibitore i HBV inhibitore. Primjeri navedenih agensa su prikazani u prethodno navedenim Definicijama.
- 45 Specifični prikladni primjeri nekih od prethodno navedenih sredstava predstavljaju:
- antivirusna sredstva: ribavirin i amantadin;
 - imunomodulatori: interferoni razreda I, interferoni razreda II i pegilirani interferoni;
 - inhibitor drugog važnog mjesta u životnom ciklusu HCV, a koje predstavlja: NS3 helikazu, HCV NS2/3 proteazu ili unutarnje mjesto ulaska na ribosomu (IRES);
 - HIV inhibitori: nukleozidni inhibitori, ne-nukleozidni inhibitori, inhibitori proteaze, inhibitori fuzije i inhibitori integreze; ili
 - HBV inhibitori: sredstva koja inhibiraju HBV virusnu DNA polimerazu ili HBV vakcina.
- 50 Kao što je prethodno navedeno, kombinirana terapija u kojoj spoj formule (1), ili njegova farmaceutski prihvatljiva sol, istodobno je primjenjen sa najmanje jednim dodatnim agensom odabranim između: antivirusnog sredstva, imunomodulatora, drugog inhibitora HCV NS3 proteaze, inhibitora HCV polimeraze, inhibitora drugog važnog mjesta u životnom ciklusu HCV, HIV inhibitora, HAV inhibitora i HBV inhibitora. Primjeri navedenih agensa su prikazani u prethodno navedenim Definicijama. Navedena se dodatna sredstva mogu kombinirati sa spojevima izuma kako bi se dobio pojedinačan farmaceutski oblik doze. Na drugi se način navedeni dodatni agensi mogu pojedinačno primijeniti kao dio multiplog oblika doze, na primjer, uporabom kita. Navedeni adicijski agensi se mogu primijeniti prije, istovremeno,
- 60 ili nakon primjene spoja formule (1), ili njegove farmaceutski prihvatljive soli.

Naziv «liječenje» označava primjenu spoja ili pripravka u skladu s prikazanim izumom koji smanjuje ili uklanja simptome bolesti hepatitisa C i/ili smanjuje količinu virusa kod bolesnika.

Kao što se ovdje koristi, naziv «prevencija» označava primjenu spoja ili pripravka prikazanog izuma kod pojedinca nakon izlaganja virusu, no prije pojave simptoma bolesti i/ili prije otkrivanja virusa u krvi.

Prikladna ostvarenja

Prikladno je spoj formule I u skladu s prethodno navedenom definicijom, u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojoj R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $\{(C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil $\}$, od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro ili O- (C_{1-6}) alkilom ili fenilom koji je po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, (C_{1-6}) alkilom ili O- (C_{1-6}) alkilom.

Prikladnije je spoj formule I u skladu s prethodno navedenom definicijom, u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja metil, etil, ciklopropil, ciklobutil, ciklopentil, ciklopropilmetil, cikloheksiletil, CCl_3 , CF_3 , fenil, 2-fluorofenil, ili 4-metilfenil.

Prikladnije je spoj formule I u skladu s prethodno navedenom definicijom, u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja metil, ciklopropil, CF_3 ili fenil. Ponovno najprikladniji R^{1A} predstavlja ciklopropil.

Najprikladnije, R^1 predstavlja hidroksi.

Najprikladnije, R^2 predstavlja ciklopentil.

U prikladna ostvarenja prikazanog izuma pripadaju svi spojevi formule I, prikazani u Tabeli 1.

U skladu s alternativnim ostvarenjem, farmaceutski pripravak prikazanog izuma može dodatno sadržavati drugi anti-HCV agens. Primjeri anti-HCV agensa obuhvaćaju α - (alfa), β - (beta), γ - (gamma) ili ω - (omega) interferon, ribavirin i amantadin.

U skladu s drugim ostvarenjem izuma, farmaceutski pripravak prikazanog izuma može pored toga sadržavati drugi inhibitor HCV NS3 proteaze.

U skladu s drugim ostvarenjem izuma, farmaceutski pripravak prikazanog izuma može dodatno sadržavati inhibitor HCV polimeraze.

U skladu s još jednim ostvarenjem izuma, farmaceutski pripravak prikazanog izuma može dodatno sadržavati inhibitor drugih važnih mjesta životnog ciklusa HCV, uključujući, bez ograničenja, inhibitor helikaze, NS2/3 proteaze ili unutarnjeg mjesta ulaska u ribosom (IRES).

Farmaceutski pripravak prikazanog izuma može se primijeniti oralnim putem, parenteralno ili putem implantiranog spremnika. Oralna primjena ili primjena injekcijama smatraju se prikladnima. Farmaceutski pripravak izuma može sadržavati bilo koje uobičajene ne-toksične farmaceutski prihvatljive nosače, adjuvanse ili vehikle. U pojedinim slučajevima, pH formulacije se može prilagoditi sa farmaceutski prihvatljivim kiselinama, bazama ili puferima kako bi se poboljšala stabilnost formuliranog spoja ili oblik za primjenu. Naziv parenteralni kao što se ovdje koristi, obuhvaća supkutani, intrakutani, intravenski, intramuskularni, intra-artikularni, intrasinovijalni, itrasternalni, intratekalni i intralezionalni put primjene putem injekcija ili infuzijskih tehnika.

Farmaceutski pripravak može biti u obliku sterilnog injekcijskog pripravka, na primjer, kao sterilna injekcijska vodena ili uljna suspenzija. Suspenzija se može formulirati tehnikama poznatim u struci primjenom prikladnih sredstava za disperziju ili vlaženje (kao što su, na primjer, Tween 80) i sredstava za suspendiranje.

Farmaceutski pripravak prikazanog izuma se može oralno primjenjivati u bilo kojem prihvatljivom obliku za oralnu primjenu uključujući, bez ograničenja, kapsule, tablete i vodene suspenzije i otopine. U slučaju tableta za oralnu primjenu, nosači koji se uobičajeno koriste obuhvaćaju laktozu i kukuruzni škrob. Sredstva za podmazivanje, kao što je magnezijev stearat, isto se tako mogu dodati. Za oralnu primjenu u obliku kapsule, korisni diluensi obuhvaćaju laktozu i isušeni kukuruzni škrob. Kada se vodene suspenzije primjenjuju oralno, aktivni sastojak je kombiniran sa emulzifikatorima i suspenzirajućim sredstvima. Po želji, određeni zaslađivači i/ili sredstva za poboljšanje okusa i/ili sredstva za bojenje se mogu dodati.

Drugi prikladni vehikli ili nosači u prethodno navedenim formulacijama i pripravcima, mogu se pronaći u standardnim farmaceutskim tekstovima, npr. u «Remingtonovim Farmaceutskim Znanostima», The Science and Practice of Pharmacy, 19. izdanje, Mack Publishing Company, Easton, Penn., (1995).

Doze se kreću od približno 0.01 do otprilike 100 mg/kg tjelesne težine na dan, prikladno od približno 0.1 do otprilike 50 mg/kg tjelesne težine na dan spoja inhibitora proteaze kao što je prethodno opisano u monoterapiji, za prevenciju i liječenje HCV uzrokovane bolesti. Uobičajeno, farmaceutski pripravak prikazanog izuma se primjenjuje 1 do 5 puta dnevno, ili na drugi način, kao kontinuirana infuzija. Navedeni način primjene se može koristiti kao kronična ili akutna terapija. Količina aktivnog sastojka koji se može kombinirati sa nosačima kako bi se proizveo pojedinačni oblik doze, ovisi o domaćinu koji se liječi i načinu primjene. Tipičan pripravak sadrži od približno 5% do otprilike 95% aktivnog sastojka (w/w). Prikladno, navedeni pripravak sadrži od približno 20% do otprilike 80% aktivnog sastojka.

Kao što će stručnjak primijetiti, ponekad je potrebno primjeriti niže ili više doze od prethodno navedenih. Specifični režimi dozaže i liječenja za pojedinog bolesnika, ovise o različitim faktorima, uključujući aktivnost specifičnog spoja, dob, tjelesnu težinu, opće zdravstveno stanje, spol, prehranu, vrijeme primjene, brzinu izlučivanja, kombinaciju lijekova, težinu i tijek infekcije, izloženosti bolesnika infekciji i samoj procjeni liječnika. Općenito, liječenje se započinje niskim dozama koje su u osnovi niže od optimalne doze peptida. Potom se doza polagano povećava do postizanja optimalnog učinka pod traženim okolnostima. Općenito, spoj se najprikladnije primjenjuje u koncentraciji koja općenito dovodi do učinkovitih antivirusnih rezultata, bez štetnog djelovanja ili pojave pogubnih nuspojava.

Kada pripravak izuma sadrži kombinaciju spoja formule I i jednog ili više dodatnih terapijskih ili profilaktičkih agensa, spoj i dodatni agens moraju biti prisutni u dozi od približno 10% do 100%, prikladnije od približno 10% do 80% doze koja se uobičajeno primjenjuje u monoterapiji.

Kada su navedeni spojevi ili njihove farmaceutski prihvatljive soli formulirani zajedno sa farmaceutski prihvatljivim nosačem, dobiveni pripravak se može primjenjivati in vivo kod sisavaca, kao što je čovjek, kako bi se inhibirala HCV NS3 proteaza ili kako bi se liječila ili prevenirala infekcija HCV virusom. Navedeno se liječenje isto tako može postići uporabom spoja prikazanog izuma u kombinaciji sa agensima koji obuhvaćaju, bez ograničenja: α -, β -, δ -, ω -, tau- ili γ -interferon, ribavirin, amantadin; druge inhibitore HCV NS3 proteaze; inhibitore HCV polimeraze; inhibitore drugih važnih dijelova HCV životnog ciklusa, koji obuhvaćaju, bez ograničenja, helikazu, NS2/3 proteazu, ili unutarne mjesto ulaska u ribosom (IRES); ili njihove kombinacije. Dodana se sredstva mogu kombinirati sa spojevima izuma kako bi se stvorio pojedinačni oblik doze.

Na drugi način, navedeni se dodatni agensi mogu primjenjivati zasebno kod sisavaca kao dio multiplog oblika doziranja.

Ako farmaceutski pripravak sadrži samo spoj prikazanog izuma kao aktivni sastojak, navedeni postupak može pored toga obuhvaćati korak primjene agensa kod sisavca kao što je imunomodulator, antivirusno sredstvo, inhibitor HCV NS3 proteaze, inhibitor HCV polimeraze ili inhibitor drugih važnih dijelova životnog ciklusa HCV kao što je inhibitor helikaze, NS2/3 proteaze ili IRES. Navedeni dodatni agens se može primijeniti kod sisavca prije, istovremeno ili nakon primjene spoja prikazanog izuma.

Prethodno prikazani spoj formule I se isto tako može koristiti kao laboratorijski reagens. Spoj prikazanog izuma se isto tako može koristiti u liječenju ili prevenciji virusne kontaminacije materijala i tako smanjiti rizik virusne infekcije laboratorijskog ili medicinskog osoblja ili bolesnika koji dolaze u kontakt sa navedenim materijalima (npr. krv, tkivo, kirurški instrumenti i predmeti, laboratorijski instrumenti i predmeti, te aparati za sakupljanje krvi i materijali).

Prethodno prikazani spoj formule I se isto tako može koristiti kao reagens u ispitivanjima. Spoj formule I se isto tako može koristiti kao pozitivna kontrola za procjenu surogatnih staničnih testova ili *in vitro* ili *in vivo* replikacijskih testova.

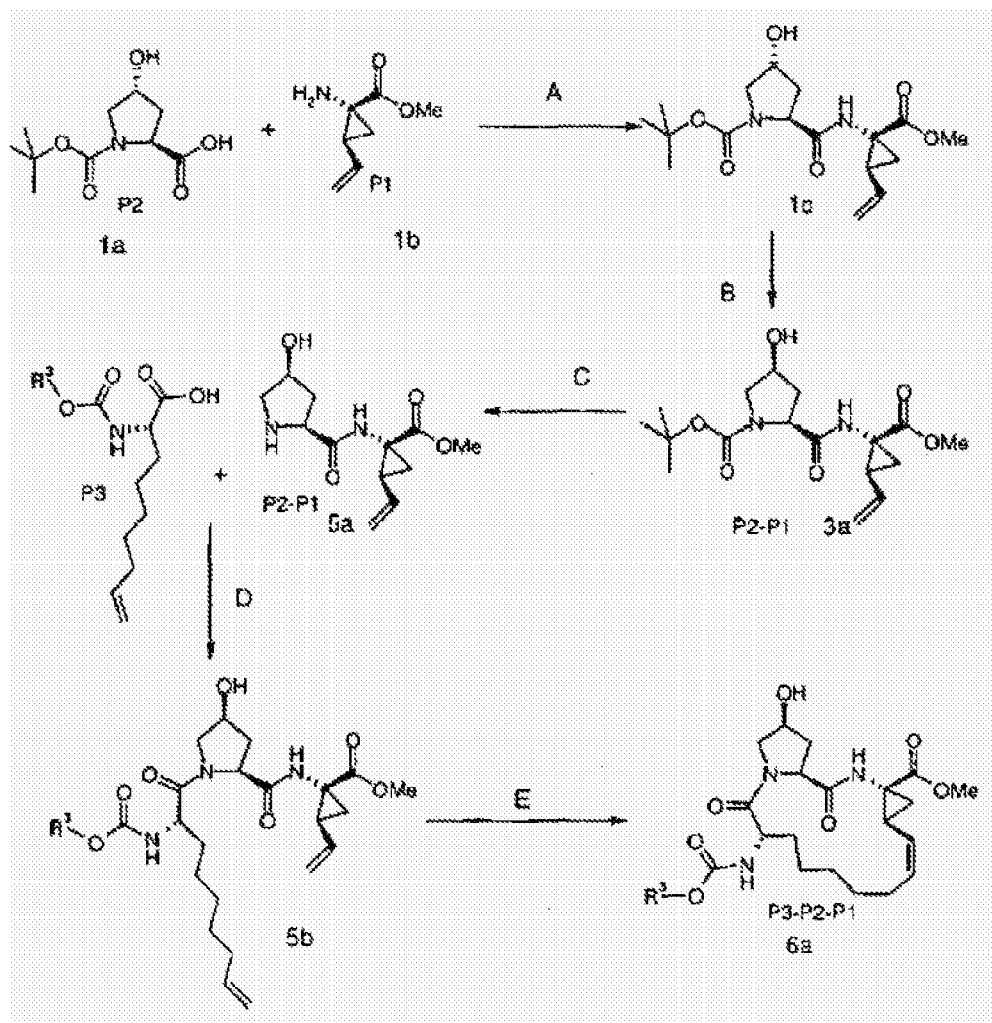
Daljnji detalji izuma su prikazani u slijedećim primjerima, a koji ne ograničavaju dodatne patentne zahtjeve.

Metodologija

Općenito, spoj formule I i međuprodukti su pripremljeni poznatim postupcima primjenom poznatih uvjeta reakcije koji su prikladni za reaktante. Nekoliko je navedenih postupaka prikazano u WO 00/09543 i WO 00/09558.

Slijedeća shema prikazuje prikladan postupak primjene poznatih metoda za pripremljanje ključnog međuprodukta formule 6a iz acikličkih međuprodukata:

SHEMA 1

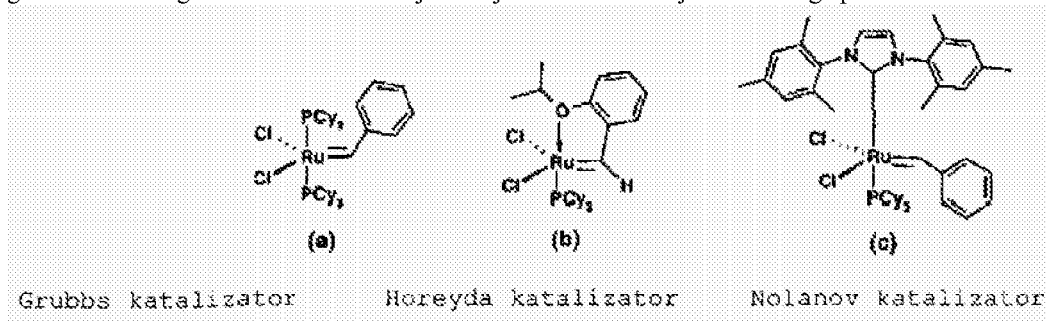


Shema I:

- 5 **Koraci A, C, D:** Ukratko, P1, P2 i P3 skupine se mogu povezati dobro poznatim tehnikama vezanja peptida koje su prikazane u WO 00/09543 & WO 00/09558.

Korak B: Navedeni korak obuhvaća inverziju konfiguracije 4-hidroksi supstituenta. Postoji nekoliko načina na koji se inverzija može ostvariti kao što je poznato osobi iz struke. Jedan primjer prikladnog postupka je dobro poznata Mitsunobu reakcija (Mitsunobu Synthesis **1981**, siječanj, 1-28; Rano i sur. Tet.Lett. **1994**, 36, 3779-3792; Krchnak i sur. Tet.Lett. **1995**, 36, 6193-6196).

Korak E: Formulacija makrocikla se može izvesti putem olefinske metateze primjenom Ru-baziranog katalizatora kao što je opisano u Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. J.Am.Chem.Soc. 1996, 118, 9606-9614 (a); Kingsbury, J.S.; Harritv, J.P.A.; Bonitatebus, P.J.; Hoveyda, A.H. J.Am.Chem.Soc. 1999, 121, 791-799 (b) i Huang, J.; Stevens, E.D.; Nolan, S.P.; Petersen, J.L.; J.Am.Chem.Soc. 1999, 121, 2674-2678 (c) ili kao što je opisano u WO 00/59929. Isto tako će biti očigledno da se mogu koristiti u navedenoj reakciji i katalizatori koji sadrže druge prelazne metale kao što je Mb.



Slijedi konverzija ključnog međuprodukta formule 6a u spojeve formule I prikazanog izuma, a detaljno je prikazana u navedenim primjerima.

Spojevi formule I u kojima R^1 predstavlja $NHSO_2R^{1A}$ u skladu s prethodno navedenom definicijom, pripremljeni su vezanjem odgovarajuće kiseline formule I (npr. R^1 predstavlja hidroksi) sa odgovarajućim sulfonamidom formule R^{1A} SO_2NH_2 u prisustvu sredstva za vezanje pod standardnim uvjetima. Premda se može koristiti nekoliko uobičajenih sredstava za vezanje, TETU i HATU se smatraju praktičnima. Sulfonamidi su dostupni na tržištu ili se mogu pripremiti poznatim postupcima.

PRIMJERI

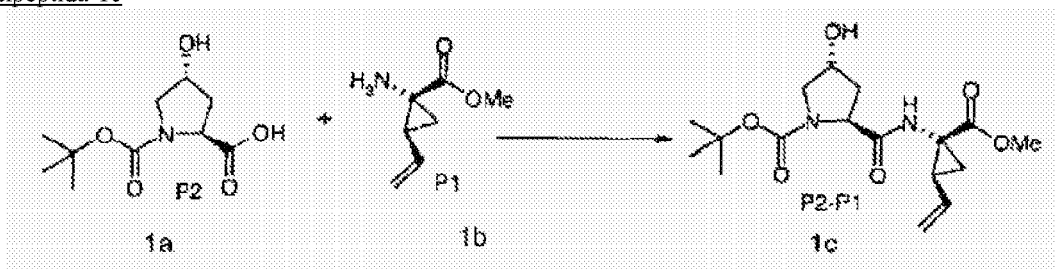
Prikazani izum je dalje detaljno ilustriran slijedećim neograničavajućim primjerima. Drugi specifični načini sinteze ili razgradnje se mogu pronaći u WO 00/09543; WO 00/09558 & WO 00/59929.

Temperature su prikazane u stupnjevima Celzijusa. Postoci otopine su izraženi odnosom mase naspram volumena, a omjeri otopine su izraženi odnosom volumena naspram volumena, ako drugačije nije izričito navedeno. Spektri nuklearne magnetske rezonance (NMR) su zabilježeni na Bruker 400 MHz spektrometru; kemijski pomaci (δ) su izraženi u dijelovima na milijun, a odnose se na unutarnji deuterirani solvent ako drugačije nije izričito navedeno. NMR spektri završnih spojeva (inhibitori) su zabilježeni u DMSO- d_6 . Fleš kromatografija na stupcu je izveden na silikagelu ($SiC > 2$) prema tehnici Stillove fleš kromatografije (W.C.Still i sur., *J.Org.Chem.*, 1978, 43, 2923).

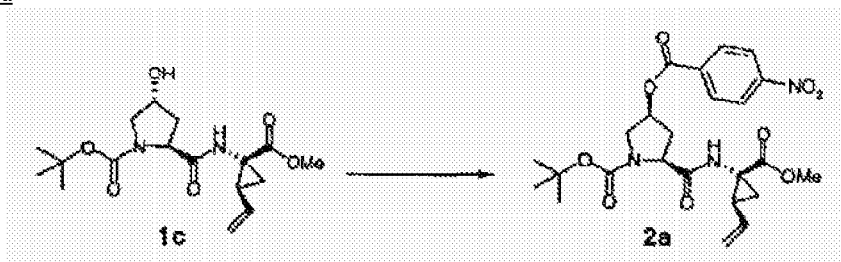
Skraćenice korištene u primjerima obuhvaćaju Boc: tere-butiloksikarbonil [$Me_3COC(O)$]; BSA: bovini serumski albumin; CHAPS: 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonat; CH_2Cl_2 =DCM: metilenski klorid; DEAD: dietilazodikarboksilat; DIAD: diizopropilazodikarboksilat; DIPEA: diizopropiletilamin; DMAP: dimetilaminopiridin; DMF: N,N-dimetilformamid; DMSO: dimetilsulfoksid; (S,S)-Et-DUPHOS Rh (COD)OTf: (+)-1,2-bis(2S,5S)-2,5-dietilfosfolano)benzen(ciktootadien) rodinij (1) trifluorometansulfonat; EtOH: etanol; EtOAc: etilni acetat; ESMS: elektroraspršivač spektrometrija mase; HATU: O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat; HPLC: tekuća kromatografija visokog učinka; MS: spektrometrija mase; MALDI-TOF: Matriksom Asistirana Ionizacija Laserske Disorpcije-Vrijeme leta, FAB: Bombardiranje Brzim Atomima; Me: metil; MeOH: metanol; R.T.: sobna temperatura (18° do $22^\circ C$); TBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronij tetrafluoroborat; TFA: trifluorooctena kiselina; THF: tetrahidrofuran; TLC: tankoslojna kromatografija; Tris/HCl: tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorid.

PRIMJER 1

Sinteza dipeptida-1c



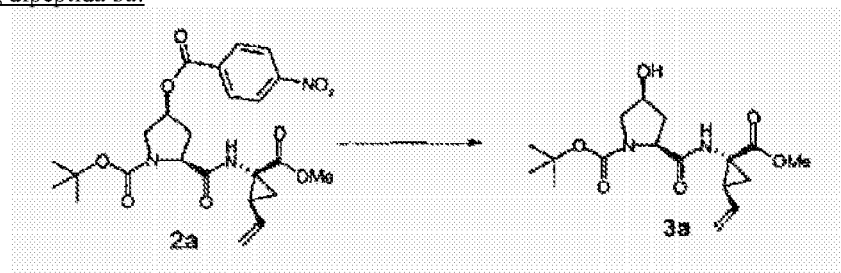
Smjesa Boc-hidroksiprolina 1a (50.0g, 216 mmola), (1R,2S)-vinil-ACCA hidroklorida 1b (42.25g, 235 mmola), TBTU (76.36g, 238 mmola) i DIPEA (113 mL, 649 mmola) u DMF (800 mL) miješana je na sobnoj temperaturi, pod atmosferom dušika. Nakon 3.5 sati, solvent je uparen, a ostatak je ekstrahiran sa EtOAc i ispran klorovodičnom kiselinom (10%), zasićenom otopinom natrijeva bikarbonata i fiziološkom otopinom. Organska faza je zatim isušena na magnezijevom sulfatu, filtrirana i uparena do nastanka ulja. Isušivanjem ulja preko noći (18h) pod visokim vakuumom dobiven je dipeptid 1c u obliku žute pjene (72.0 g, 94%, čistoće $> 95\%$ putem HPLC).

PRIMJER 2Sinteza dipeptida 2a

- 5 Dipeptid 1c (72.0g, 203.8mmol), trifenilfosfin (63.94g, 243.8mmol, 1.2ekviv.) i 4-nitrobenzojeva kiselina (41.08g, 245.8mmol, 1.2ekviv.) je otopljeno u suhom THF (1.4L), a promiješana je otopina ohlađena na 0°C pod atmosferom dušika. Potom je dodavano u dijelovima DEAD (38.4mL, 244mmol, 1.2ekviv.) tijekom 45 minuta i reakcijska smjesa je ostavljena da se ugrije do sobne temperature. Nakon 4 sata, solvent je uparen, a ostatak je podijeljen na četiri dijela.
- 10 Svaki dio je kromatografirao na finom silikagelu (10-40 um veličine okna, promjer stupca 12 cm, duljina stupca 16 cm) primjenom gradijenta 2:1 heksana/EtOAc do 1:1 heksan/EtOAc, do čistog EtOAc. Ester 2a je dobiven u obliku amorfne bijele krute tvari, nakon uparavanja solventa i isušivanja pod visokim vakuumom na temperaturi od 70°C tijekom 1 sata (108.1 g, kvantitativni donos).

PRIMJER 3

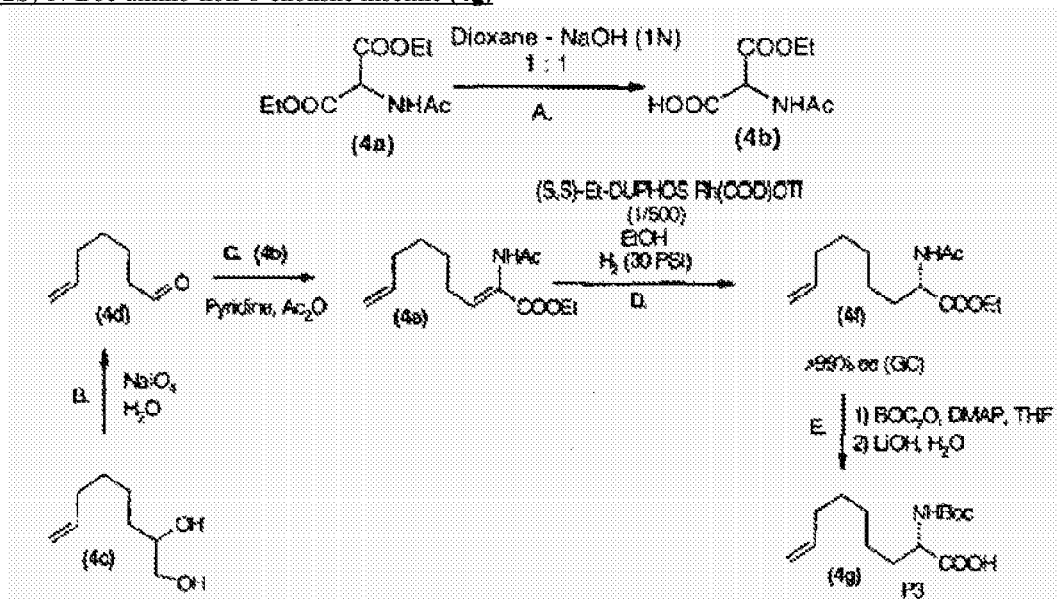
15

Sinteza alkoholnog dipeptida 3a:

- Nitrobenzoilni ester 2a (108.1g, 203.1 mmol) je otopljen u THF (1.0L), a dobivena je otopina ohlađena na 0°C. Otopina litijeva hidroksid monohidrata (10.66g, 253.9mmol) u vodi (225mL) je potom brzo dodana i reakcijska smjesa je miješana na 0°C tijekom 30 minuta, nakon čega je preostala baza neutralizirana klorovodičnom kiselinom (IN, 50.8mL). Dodatna količina kiseline je polagano dodavana sve do raspršenja žute boje (7mL). Dobivena je smjesa zatim uparena, a ostatak je ekstrahirao sa EtOAc (3 x 150 mL). Ekstrakt je ispran zasićenom otopinom natrijeva bikarbonata (150mL) i fiziološkom otopinom (150 mL). Organska faza je isušena na magnezijevom sulfatu-drvenom ugljenu, filtrirana kroz dijatomejsku zemlju i uparena. Sušenjem ostatka preko noći pod visokim vakuumom dobiven je alkohol 3a u obliku bezbojne pjene (70.1 g, 98%, čistoće >99% putem HPLC).
- 20
- 25

PRIMJER 4

Sinteza (2S)-N-Boc-amino-non-8-enskne kiseline (4g)



- 5 **Korak A.** Otopini na tržištu dostupnog dietil 2-acetamido-malonata 4a (100 g, 0.46mola) u dioksanu (500 mL) je dodavana kap po kap vodene otopine natrijeva hidroksida (IM, 1 ekv., 360mL) tijekom 30 do 45 minuta. Dobivena smjesa je miješana tijekom 16.5 sati, zatim je dioksan uparen *in vacuo*. Dobivena vodena otopina je ekstrahirana sa tri porcije 300mL EtOAc i zakiseljena do pH 1 sa koncentriranom HCl. Otopina je ostavljena da kristalizira u ledeno-vodenoj kupelji. Nakon pojave nekoliko kristala, smjesa je obrađena ultrazvučno i dobiven je suvišak precipitata.
- 10 Filtracijom i isušivanjem pod vakuumom dobiven je spoj 4b, (62.52g, 72% donosa) u obliku bijele krute tvari.

- Korak B.** Magnetski promiješanoj emulziji na tržištu dostupnog 7-okten-1,2-diola 4c (25g, 0.173 mola) i H₂O (100 mL), u posudi okrugla dna od 1L, dodavana je vodena otopina natrijeva periodata (40.7 g, 0.190 mola, 1.1 ekviv., u 475 mL H₂O) tijekom 20 minuta (blago egzotermično). Dobivena je smjesa miješana na sobnoj temperaturi tijekom dodatnih sat vremena (završetak reakcije je potvrđen TLC). Smjesa je zatim dekantirana u posudi za razdvajanje, a vodeni sloj je odvojen od organskog sloja. Vodena je otopina zasićena sa NaH, dekantirana i još jedanput odvojena od organske frakcije. Dvije su organske frakcije kombinirane, isušene sa natrijevim sulfatom i filtrirane preko pamučnog čepa (u Pasteurovoj pipeti) do nastanka spoja 4d (15.135 g, bezbojno ulje, 78% donos). Vodena je otopina ekstrahirana sa CH₂Cl₂, isušena sa anhidroznim MgSO₄, te koncentrirana pod vakuumom (bez zagrijavanja, tj. 6-neptanal b.p. 153°C) do nastanka dodatne količine spoja 4d (1.957 g, bezbojno ulje, 10% donos). Ukupan donos iznosi 88%.
- 15
- 20

- Korak C.** Krutom etilnom 2-acetamidomalonatu 4b (7.57g, 40 mmol) je dodan 6-heptenal 4d (4.48g, 40 mmol) u otopini piridina (32 mL, 10 ekviv.) tijekom 1 minute. Dobivena je otopina ohlađena u vodenoj kupelji na 10°C. Dodavan je tijekom 4 minute octeni anhidrid (12 mL, 3.2 ekviv.). Dobivena narančasta otopina je miješana tijekom 3 sata na sobnoj temperaturi i dodatna porcija etilnog 2-acetamidomalonata 4b (2.27 g) je dodana. Dobivena je smjesa miješana na sobnoj temperaturi tijekom dodatnih 11 sati. Potom je dodan led (60 mL) i otopina je miješana tijekom 1.5 sata, zatim je razrijeđena sa 250 mL vode i ekstrahirana sa dva dijela dietilnog etera. Eterska otopina je isprana sa 1N HCl, zasićenom NaHCO₃, isušena sa Na₂SO₄, koncentrirana i pročišćena fleš kromatografijom (EtOAc 40% / heksan) do nastanka spoja 4e (4.8 g, 50% donos) u obliku svijetložutog ulja.
- 25
- 30

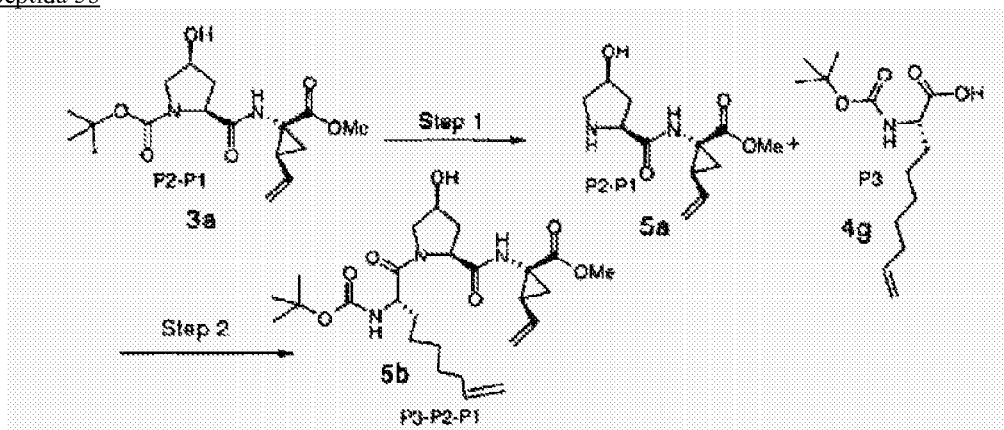
- Korak D.** Otopini Z-etil 2-acetamido-2,8-nonadienoata 4e (8.38 g, 35 mmol) u suhom etanolu (70 mL), iz koje je uklonjen plin (argon u mjehurićima tijekom 30 minuta), dodan je (S,S)-Et-DUPHOS Rh(COD)Otf (51 mg, (supstrat/katalizator = 496). Smjesa je stavljena pod 30 psi vodika (nakon 4 vakuum-H₂ ciklusa) i miješana je na Parr stroju za tresenje tijekom 2 sata. Dobivena je smjesa uparena do isušivanja kako bi se dobio nepročišćeni spoj 4f, koji je korišten u slijedećim koracima reakcije bez daljnjeg pročišćavanja.
- 35

- Korak E.** Otopini nepročišćenog (S)-etil 2-acetamido-8-nonenaoata 4f (7.3 g, 30.3 mmol) u THF (100 mL), dodani su Boc₂O (13.2 g, 2 ekviv.) i DMAP (740 mg, 0.2 ekviv.). Reakcijska smjesa je zagrijavana na refluxu tijekom 2.5 sata. Nakon toga je većina THF solventa uparena, nepročišćena smjesa je razrijeđena sa CH₂Cl₂ i isprana sa 1N HCl kako bi se uklonio DMAP. Organski je sloj nadalje ekstrahiran zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, isušan anhidroznim Na₂SO₄ i koncentriran pod vakuumom. Nepročišćeni je produkt zatim razrijeđen sa THF (50 mL) i vodom (30 mL), dodan je LiOH.H₂O (2.54 g, 2 ekviv.) i dobivena je smjesa miješana na sobnoj temperaturi tijekom 25 sati (završetak
- 40

hidrolize je potvrđen TLC). Reakcijska je smjesa koncentrirana pod vakuumom kako bi se uklonila većina THF solventa i razrijeđena je sa CH_2Cl_2 . Dobivena je otopina isprana sa 1 N HCl, isušena je anhidroznim Na_2SO_4 i koncentrirana pod vakuumom. Kako bi se uklonile manje nečistoće i suvišak Boc_2O , nepročišćeni produkt je pročišćen fleš kromatografijom (uporabom gradijenta solventa od 100% heksana - 100% EtOAc kao eluensa). Dobiven je spoj iz naslova, 4g, visoke čistoće u obliku svijetložutog ulja (5.82g, 71% donos). ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 7.01 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 5.79 (td, $J_t = 6.7$ Hz, $J_d = 17.0, 10.2$ Hz, 1H), 5.00 (md, $J_d = 17.0$ Hz, 1H), 4.93 (md, $J_d = 10.2$ Hz, 1H), 3.83 (m, 1H), 2.00 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.65 - 1.5 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.35 - 1.21 (m, 6H).

PRIMJER 5

Sinteza tripeptida 5b

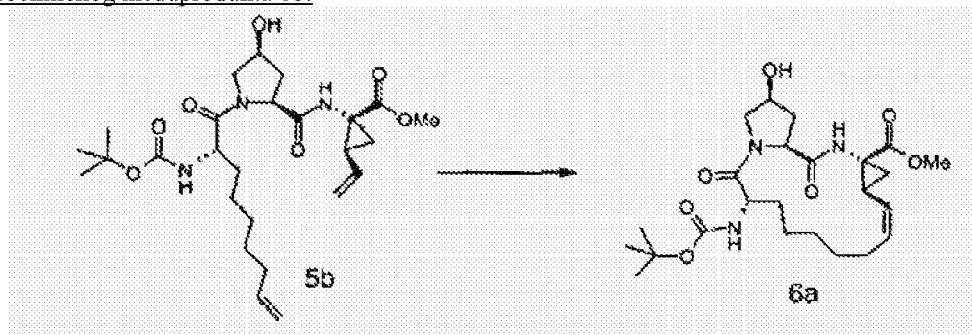


Korak 1: Otopina vodikova klorida u dioksanu (4N) je dodana u Boc P2-P1 fragment 3a (5.32 g, 15.0 mmol) rezultirajući bezbojnom otopinom. Nakon 1 sata miješanja na sobnoj temperaturi, solvent je uparen, a ostatak je stavljen pod visoki vakuum tijekom 3 sata što je dovelo do nastanka hidrokloridne soli spoja 5a u obliku amorfnе krute tvari koja je korištena kao takva.

Korak 2: DIPEA (2.6 mL, 15 mmol) je dodana smjesi prethodno pripravljenog P1-P2 hidroklorida (15 mmol) u suhom DCM (100 mL) rezultirajući homogenom otopinom. Zasebno jedodan TBTU (5.30 g, 16.5 mmol, 1.1 ekviv.) promiješanoj otopini C9-veznog sredstva 4g (4.07 g, 15.0 mmol) u suhom DCM (130 mL) rezultirajući djelomičnom otopinom reagensa. DIPEA (2.6 mL, 15 mmol) je dodavana do nastanka u osnovi homogene otopine nakon 10 minuta. U navedenu je otopinu dodana P1-P2 otopina i DIPEA do postizanja bazičnih vrijednosti reakcijske smjese ($\text{pH} > 8$ na vlažnom litmus papiru). Nakon miješanja pod atmosferom dušika tijekom 5 sati, solvent je uparen, a ostatak je ekstrahiran sa EtOAc (2 x 250 mL) i ispran razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (0.05N, 400 mL), vodom (400 mL) i zasićenom otopinom natrijeva bikarbonata (400 mL). Kombinirane organske faze su zatim isušene na magnezijevom sulfatu, filtrirane i uparene cio nastanka žutog sirupa. Nepročišćeni produkt je kromatografiran na silikagelu, uporabom 6:1 EtOAc/heksana do čistog EtOAc kao eluensa, dajući željeni tripeptid, dien 5b, u obliku bijele pjene (5.88 g, 82%, čistoća >95% određena pute HPLC).

PRIMJER 6

Sinteza makrocikličkog međuprodukta 6b:



Otopina diena 5b (4.0 g, 7.88 mmol) u suhom DCM (800 mL) je deoksigenirana putem mjehurića Ar tijekom 2 sata. Potom je dodan Hoveyda katalizator (262 mg, 0.434 mmol, 5.5 mol%) u obliku krute tvari i reakcijska je smjesa ostavljena u refluksu pod Ar balonom. Nakon 28 sati, crveno-narančasta otopina je uparena do nastanka amorfnе krute tvari, a zatim je pročišćena fleš kromatografijom na stupcu silikagela. Početni sustav solventa bio je 10% EtOAc u CH_2Cl_2 . Kada je katalizator jedanput eluiran sa stupca, solvent je promijenjen u čisti EtOAc. Eluiranje katalizatora sa

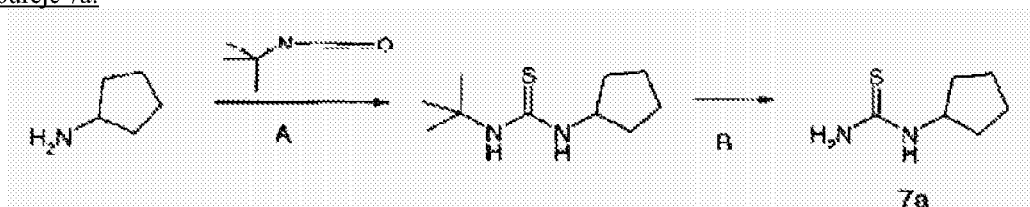
stupca je bilo očigledno po njegovoj boji. Makrociklički produkt 6a je izoliran u obliku bezbojne pjene koja je ponovno otopljena u CH_2Cl_2 /heksanu (-1:2). Uparavanjem solventa dobiven je bijeli prah (3.362 g, 89% donosa).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.20-1.50 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.53 (dd, $J=9.5$ & 5.4, 1H), 1.61-1.70 (m, 1H), 1.76-1.90 (m, 2H), 2.05-2.26 (m, 4H), 2.45 (d, $J=14.3$, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.71 (d, $J=11.1$, 1H), 3.90 (dd, $J=11.1$ & 4.3, 1H), 4.43-4.53 (m, 2H), 4.76 (d, $J=8.6$, 1H), 4.86 (bd, $J=9.8$, 1H), 5.20-5.23 (m, 2H), 5.57 (dt, $J=7.0$ & 9.8, 1H), 7.32 (bs, 1H).

PRIMJER 7

10 Pripravljanje Tiourea 7

Sinteza tiourea 7a:

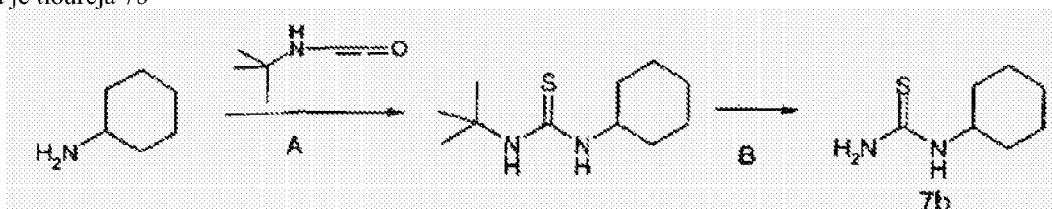


Otopini terc-butil izotiocijanata (5.0 mL; 39.4 mmol) u DCM (200 mL) dodan je ciklopentilamin (4.67 mL; 47.3 mmol), potom je dodana DIPEA i reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Smjesa je razrijeđena sa EtOAc, isprana sa 10% vodenom otopinom limunske kiseline (2x), zasićenom otopinom NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) i fiziološkom otopinom (1x). Organski je sloj isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen do nastanka N-terc-butil-N'-ciklopentil tiourea u obliku bijele krute tvari (3.70g; 47% donos). N-terc-butil-N'-ciklopentil tiourea (3.70 g) je otopljena u koncentriranoj HCl (46 mL). Tamnožuta otopina je ostavljena pod blagim refluksom. Nakon 40 minuta reakcijska smjesa je ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu, a zatim je ohlađena u ledu i bazificirana do pH 9.5 sa krutom i zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 . Produkt je ekstrahiran u EtOAc (3x), kombinirani EtOAc ekstrakti su isprani sa H_2O (2x) i fiziološkom otopinom (1x). Organski sloj je isušen (MgSO_4), filtriran i koncentriran do nastanka bež krute tvari (2.46 g nepročišćena). Trituriranjem krutog materijala u heksanu/EtOAc 95/5, nakon filtracije, dobivena je N-ciklopentiltiourea 7a u obliku bijele krute tvari (2.38; 90% donosa).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.58 (bs, 1H), 7.19 (bs, 1H), 6.76 (bs, 1H), 4.34 (bs, 1H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 1.55-1.30 (m, 4H). MS; m/z 144.9 ($\text{M} + \text{H}^+$), m/z 142.8 ($\text{M}-\text{H}^-$).

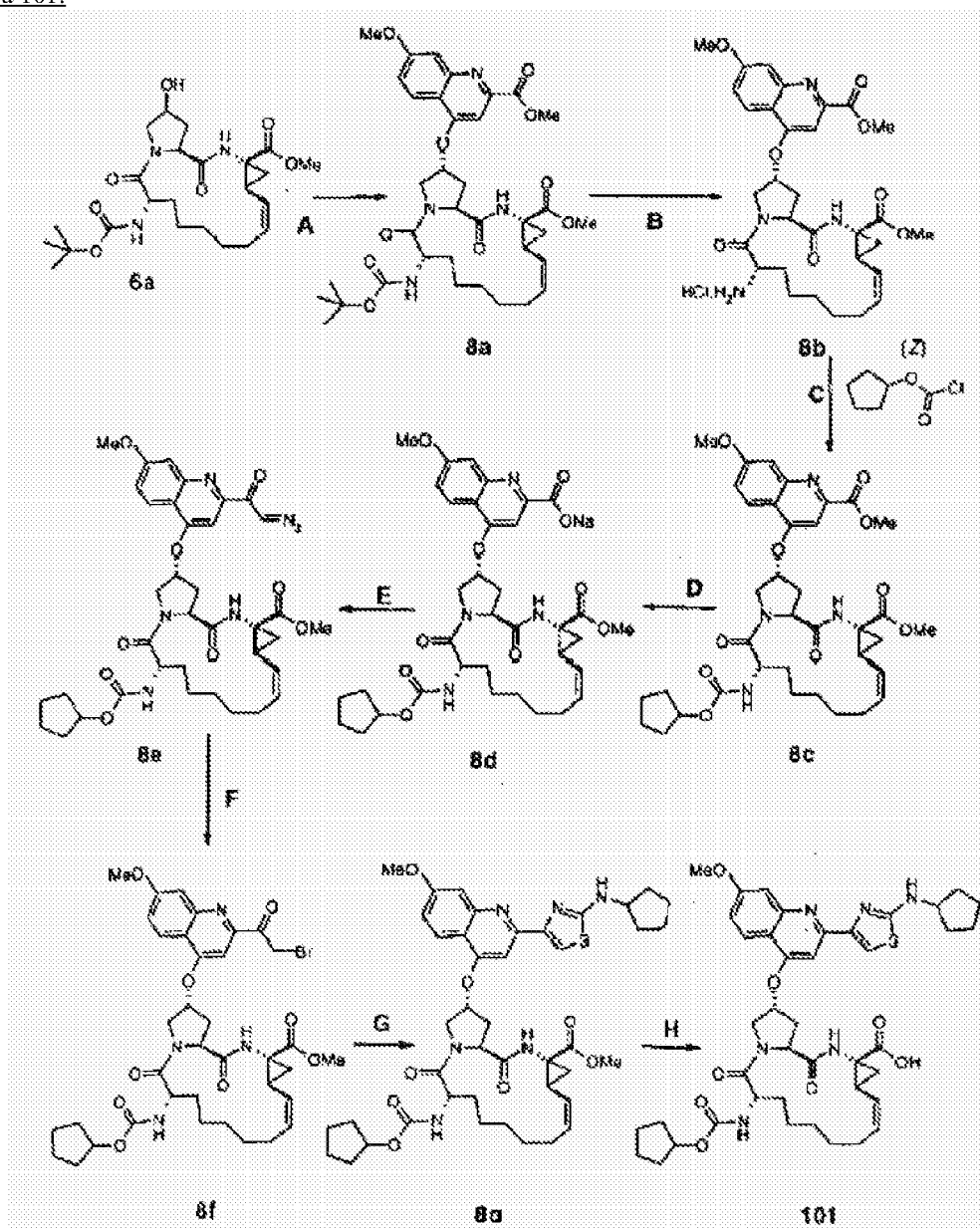
Pripravljanje tiourea 7b

Uporabom prethodno opisanog postupka i primjenom na tržištu dostupnog cikloheksilamina (umjesto ciklopentilamina) dobivena je tiourea 7b



PRIMJER 8

Sinteza Spoja 101:



5

Korak A. Otopini makrocikličkog međuprodukta 6a (13.05 g, 27.2 mmol, 1.0 ekviv.), Ph_3P (14.28 g, 54.4 mmol, 2.0 ekviv.) i 2-karboksimetoksi-4-hidroksi-7-metoksikinolina (WO 00/09543; WO 00/09558 & WO 00/59929) (6.67 g, 28.6 mmol, 1.05 ekviv.) u THF (450 mL) na 0°C , dodavan je kap po kap DIAD (10.75 mL, 54.6 mmol, 2.0 ekviv.) tijekom 15 minuta. Ledena kupelj je zatim uklonjena i reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 3 sata. Nakon potpune konverzije početnog materijala u produkte, solvent je uparen pod vakuumom, preostala smjesa je razrijeđena sa EtOAc, isprana zasićenom otopinom NaHCO_3 (2x) i fiziološkom otopinom (1x), organski sloj je isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen do isušivanja. Dobiven je čisti spoj 7a nakon fleš kromatografije na stupcu; stupac je eluiran prvo sa heksanom/EtOAc (50:50), potom $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ (95:5) kako bi se uklonio Ph_3PO i DIAD nusprodukte, a eluiranje nečistoća je praćeno TLC. Naposljetku, očekivani produkt 8a je eluiran na stupcu sa $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ (70:30). Obično se kromatografija mora ponoviti 2-3 puta prije izolacije spoja 8a, visoke čistoće u obliku bijele krute tvari ukupnog donosa 68% (12.8 g, 99.5% čistoće putem HPLC).

Korak B. Otopini Boc-zaštićenog međuprodukta 8a (1.567 g) u CH_2Cl_2 (15 mL), dodano je 4N HCl u dioksanu (12 mL). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 1 sata. [U slučaju kada nastane gusti gel u sredini reakcije, dodatnih 10 mL CH_2Cl_2 se dodaje.] Nakon završetka deprotekcije solventi su upareni do isušivanja kako bi se dobio materijal poput žute krute tvari i paste. Smjesa je ponovno otopljenja u približno 5% MeOH u CH_2Cl_2 i ponovno

20

uparena do isušenja pod vakuumom kako bi se dobio spoj 8b u obliku žute krute tvari, koja je korištena u sljedećem koraku bez pročišćavanja.

Korak C. Otopini ciklopentanola (614 μ L, 6.76 mmol) u THF (15 mL), dodana je kap po kap otopina fosgena u toluenu (1.93M, 5.96 mL, 11.502 mmol) i smjesa je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata do nastanka ciklopentil kloroformatnog reagensa (z). Nakon navedenog perioda, približno polovina solventa je uklonjena uparavanjem pod vakuumom. Ostatak svijetložute otopine je razrijeđen dodatkom CH_2Cl_2 (5 mL) i koncentriran do polovine njezinog originalnog volumena, kako bi se osiguralo uklanjanje cijelog suviška fosgena. Prethodno navedena otopina ciklopentilnog kloroformatnog reagensa je dalje razrijeđena sa THF (15 mL) i dodana amin-2HCl soli 8b. Smjesa je ohlađena na 0°C u ledenoj kupelji, pH je prilagođen na -8.5-9 dodatkom Et_3N (dodan kap po kap) i reakcijska smjesa je miješana na 0°C tijekom 1 sata. Nakon navedenog perioda, smjesa je razrijeđena sa EtOAc, isprana vodom (1x), zasićenim NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) i fiziološkom otopinom (1x). Organski sloj je isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen pod vakuumom do nastanka žuto-jantarne pjene. Dobiven je dimetilni ester 8c u obliku bijele pjene, nakon pročišćavanja fleš kromatografijom na stupcu (uporabom gradijenta solventa od 30% heksana do 20% heksana u EtOAc kao eluentu) u donosu od 80% (1.27 g) i >93% čistoće.

Korak D. Dimetilni ester 8c (1.17 g) je otopljen u smjesi THF/MeOH/ H_2O (20 mL, 2:1:1 omjer) i dodana je vodena otopina NaOH (1.8 mL, 1N, 1 ekviv.). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 1 sata prije uparavanja do isušenja kako bi se dobila natrijeva sol 8d u obliku bijele krute tvari (-1.66 mnaol). Spoj 8d je korišten u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.

Korak E. Nepročišćena natrijeva sol 8d (1.66 mmol) je otopljena u THF (17 mL), dodan je Et_3N i smjesa je ohlađena na 0°C u ledenoj kupelji. Dodan je kap po kap izobutilkloroformat (322 μ L, 2.5 mmol) i smjesa je miješana na 0°C tijekom 75 minuta. Nakon toga je dodan diazometan (15 mL) i miješanje je nastavljeno na 0°C tijekom 30 minuta, a zatim na sobnoj temperaturi tijekom dodatnih sat vremena. Većina solventa je uparena do isušenja pod vakuumom, ostatak smjese je razrijeđen sa EtOAc, ispran zasićenom otopinom NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) i fiziološkom otopinom (1x), isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen do isušenja dajući spoj 8e u obliku svijetložute pjene (1.2 g, - 1.66 mmol). U sljedećem je koraku korišten diazoketonski međuprodukt 8e bez daljnjeg pročišćavanja.

Korak F. Otopina diazoketona 8e (1.2 g, 1.66 mol) je otopljena u THF (17 mL) i ohlađena na 0°C u ledenoj kupelji. Vodena otopina HBr (48%, 1.24 mL) je dodavana kap po kap i reakcijska smjesa je miješana na 0°C tijekom 1 sata. Smjesa je zatim razrijeđena sa EtOAc, isprana zasićenom otopinom NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) i fiziološkom otopinom (1x). Organski sloj je isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen do isušenja dajući a-bromoketonski međuprodukt 8f u obliku svijetložute pjene (~1.657 mmol).

Korak G. Otopini bromoketona 8f (2.51 g, 3.27 mmol) u izopropanolu (105 mL), dodana je ciklopentiltioureja 7a (565 mg, 3.92 mmol) i reakcijska smjesa je stavljena u prethodno zagrijanu uljnu kupelj na 70°C , gdje je miješana tijekom 1.5 h. Izopropanol je zatim uklonjen pod vakuumom, a produkt je otopljen u EtOAc. Otopina je isprana zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 , vodom i fiziološkom otopinom, organski je sloj isušen na anhidroznom MgSO_4 , filtriran i uparen do nastanka nepročišćenog produkta 8g (1.35 g) u obliku svijetložute krute tvari. Nepročišćeni produkt je pročišćen fleš kromatografijom na silikagelu (1:1 heksan/EtOAc) do nastanka 2.12 mg prljavo bijele krute tvari (80% donos).

Korak H. Metilni ester 8g (1.82 g, 2.2 mmol) je otopljen u otopini THF/MeOH/ H_2O (38/20/18 mL) i saponificiran sa $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (935 mg, 22.3 mmol). Reakcija hidrolize je sprovedena tijekom 18 sati na sobnoj temperaturi. Nakon toga je otopina uparena do isušenja dajući prljavo bijelu pastu. Pasta je razrijeđena sa EtOAc i fiziološkom otopinom. Vrijednost pH smjese je prilagođena na 6 dodatkom 1N HCl. Sloj EtOAc je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahiran dva puta sa EtOAc. Kombinirani EtOAc ekstrakti su isprani deioniziranom vodom (2X) i fiziološkom otopinom (IX), isušeni (MgSO_4) i upareni do nastanka cikličkog tripeptidnog spoja 101 u obliku žute krute tvari (1.76 g; 99% donosa).

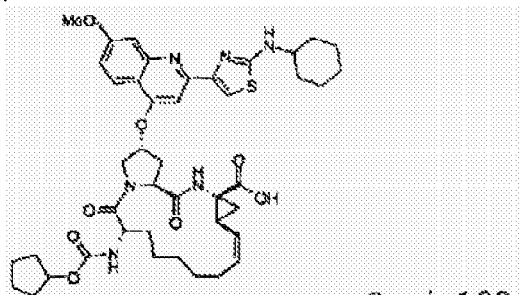
Pretvorba u Na sol

Spoj 8h (106 mg; 0.132 mmol) je otopljen u MeOH (20 mL) i dodano je 0.01N otopine NaOH (13.2 mL). Bistra žuta otopina je razrijeđena vodom, zamrznuta i liofilizirana do nastanka spoja 8h, Na soli žuto-bijele amorfnе krute tvari (106 mg; 97% donos).

M.S.(elektroaspršivač): 799.3 (M-H)- 801.4 (M+H) HPLC reverzne faze homogenosti (0.06% TFA ; CH_3CN : H_2O): 99%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 8.02 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.90 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.44 (bs, 2H), 7.27 (d, J= 1.9 Hz, 1H), 7.11 (d, J= 7.0 Hz, 1H), 7.03 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 5.48 (dd, J= 18.4, 9.9 Hz, 1H), 5.43 (bs, 1H), 5.15 (dt, J= 17.8, 7.63 Hz, 1H), 4.70 (bs, 1H), 4.49-4.34 (m, 2H), 4.34-4.25 (m, 1H), 4.13-4.03 (m, 1H), 3.99-3.86 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.58-2.44 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.15-1.93 (m, 4H), 1.83-1.14 (m, 24H), 1.14-1.12 (m, 1H).

PRIMJER 9

Primjenom istog postupka kao što je opisano u Primjeru 8, no u koraku G, primjenom N-cikloheksiltioureje 7b, dobivena je natrijeva sol spoja 102.



Spoj 102

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8.02 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.86 (bs, 1H), 7.78 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.43 (s, 2H), 7.27 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J=9.2, 1.9$ Hz, 1H), 5.57-5.40 (m, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.26-5.17 (m, 1H), 4.70 (bs, 1H), 4.52-4.35 (m, 2H), 4.29-4.23 (m, 1H), 4.18-4.00 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.87-3.65 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.19-2.10 (m, 1H), 2.07-1.96 (m, 3H), 1.82-0.95 (m, 28H). MS; m/z 815.4 ($M+H$) $^+$, m/z 813.4 ($M-H$) $^-$.

PRIMJER 10NS3-NS4A test proteaze

Enzimski test korišten u procjeni prikazanog spoja, opisan je u WO 00/09543 i WO 00/59929.

PRIMJER 11Stanični HCV RNA replikacijski test Stanična kultura:

Huh7 stanice koje stabilno zadržavaju subgenomski HCV replikon su postavljene kao što je prethodno opisano (Lohman i sur., 1999. Science 285: 110-113) i označene kao S22.3 stanična linija (WO 02/052015). S22.3 stanice su ostavljene u Dulbeccovom modificiranom Earle mediju (DMEM) obogaćenom sa 10% FBS i 1 mg/mL neomicina (Standardni medij). Tijekom ispitivanja, korišten je DMEM medij obogaćen sa 10% FBS, sadržaja 0.5% DMSO, a bez neomicina. 16 sati prije dodavanja spoja, S22.3 stanice su bile tripsinizirane i razrijeđene do 50 000 stanica/ml Standardnog medija. 200 μL (10 000 stanica) je distribuirano u svaku jažicu 96-jažične ploče. Ploča je zatim inkubirana na 37°C sa 5% CO_2 do slijedećeg dana.

Reagensi i materijali:

Produkt	Kompanija	Katalog #	Skladištenje
DMEM	Misent Inc.	10013CV	4°C
DMSO	Sigma	D-2650	R. T.
Dulbecco PBS	Gibco-BRL	14190-136	R. T.
Fetalni bovini serum	Bio-Whittaker	14-901F	-20°C/4°C
Neomicin (G418)	Gibco-BRL	10131-027	-20°C/4°C
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL	25300-054	-20°C/4°C
96- jažične ploče	Costar	3997	R. T.
PVDF 0.22 μm Filterska jedinica	Milipore	SLGV025LS	R. T.
Polipropilen duboko-jažične titarske ploče	Beckman	267007	R. T.

Pripravljanje ispitivanog spoja

10 μL ispitivanog spoja (u 100% DMSO) je dodano u 2 ml medija za ispitivanje do ukupne DMSO koncentracije od 0.5% i otopina je izložena djelovanju ultrazvuka tijekom 15 minuta, te filtrirana kroz 0.22 μm Millipore Filtersku jedinicu. 900 μL je prebačeno u red A Polipropilenske duboko-jezične titarske ploče. Redovi B do H, sadrže 400 μL alikvota medija za ispitivanje (sadržaja 0.5% DMSO) i korišteni su za pripravljanje serijskih razrjeđenja (1/2) prebacivanjem 400 μL iz reda u red (red H je bio bez spoja).

Aplikacija ispitivanog spoja u stanice

Medij stanične kulture je aspiriran iz 96-jažičnih ploča koje sadrži S22.3 stanice. 175 μL medija za ispitivanje odgovarajućeg razrjeđenja ispitivanog spoja je prebačeno iz svake jažice ploče koja sadrži spoj u odgovarajuću jažicu ploče sa staničnom kulturom (red H je korišten kao «kontrola bez inhibicije»). Ploča stanične kulture je inkubirana na 37°C sa 5% CO_2 tijekom 72 sata.

Ekstrakcija ukupne stanične RNA

Nakon inkubacijskog perioda od 72 sata, ukupna stanična RNA je ekstrahirana iz 522.3 stanica 96-jažične ploče uporabom RNeasy 96 kita (Qiagen®, RNeasy Priručnik, 1999.)- Ukratko, medij za ispitivanje je u potpunosti uklonjen iz stanica i dodano je u svaku jažicu 96-jažične ploče stanične kulture, 100 µL RLT pufera (Qiagen®) koji sadrži 143 mM β-merkaptotetanol. Mikroploča je lagano tresena tijekom 20 sekundi. Potom je dodano 100 µL 70% etanola u svaku mikrojažičnu ploču i pomiješano pipetiranjem. Lizat je uklonjen i nanesen u svaku jažicu RNeasy 96 (Qiagen®) ploče koja je stavljena na vrh Qiagen® Kvadratnog jažičnog bloka. RNeasy 96 ploča je zatim zapečaćena vrpcom i Kvadratni jažični blok sa RNeasy 96 pločom je stavljen u držač i postavljen u rotorsko vedro 4K15C centrifuge. Uzorak je centrifugiran na 6000 rpm (-5600 x g) tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi. Vrpca je uklonjena sa ploče i 0.8 ml pufera RW1 (Qiagen® RNeasy 96 kit) je dodano u svaku jažicu RNeasy 96 ploče. RNeasy 96 ploča je zapečaćena sa novim komadom vrpce i centrifugirana na 6000 rpm tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi. RNeasy 96 ploča je stavljena na vrh drugog čistog Kvadratnog jažičnog bloka, traka je uklonjena i 0.8 ml pufera RPE (Qiagen® RNeasy 96 kita) je dodano u svaku jažicu RNeasy 96 ploče. RNeasy 96 ploča je zapečaćena sa novim komadom vrpce i centrifugirana na 6000 rpm tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi. Vrpca je uklonjena i drugih 0.8 ml pufera RPE (Qiagen® RNeasy 96 kita) je dodano u svaku jažicu RNeasy 96 ploče. RNeasy 96 ploča je zapečaćena sa novim komadom vrpce i centrifugirana na 6000 rpm tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vrpca je uklonjena, RNeasy 96 ploča je stavljena na vrh stalka koji sadrži 1.2-mL kolekciju mikrocejevica. RNA je eluirana dodatkom 50 pL RNaza-slobodne vode u svaku jažicu, ploča je zapečaćena sa novim komadom vrpce, inkubirana tijekom 1 minute na sobnoj temperaturi.

Ploča je zatim centrifugirana na 6000 rpm tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi. Korak eluiranja je ponovljen sa drugim volumenom od 50 µL RNaza-slobodne vode. Mikrocejevica sa ukupnom staničnom RNA su pohranjene na -70°C.

Kvantificiranje ukupne stanične RNA

RNA je kvantificirana na STORM® sistemu (Molecular Dynamics®) uporabom RiboGreen® RNA Kvantifikacijskog kita (Molekulske probe®). Ukratko, RiboGreen reagens je razrijeđen 200-puta u TE (10 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM EDTA). Općenito, 50 µL reagensa je razrijeđeno u 10 mL TE. Standardna krivulja ribosomske RNA je razrijeđena u TE do 2 µg/mL i prethodno određene količine (100, 50, 40, 20, 10, 5, 2 i 0 µL) otopine ribosomske RNA su potom prebačene na novu 96-jažičnu ploču (COSTAR # 3997) i volumen je nadopunjen do 100 µL sa TE. Općenito, stupac 1, 96-jažične ploče je korišten za određivanje standardne krivulje, a druge su jažice korištene za RNA uzorke koji se kvantificiraju. 10 µL svakog RNA uzorka koji će biti kvantificiran, prebačeno je u odgovarajuću jažicu 96-jažične ploče i dodano je 90 µL TE. U svaku jažicu 96-jažične ploče je dodan jedan volumen (100 µL) razrijeđenog RiboGreen reagensa i ploča je inkubirana tijekom 2 do 5 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla (10 µL RNA uzorak u 200 µL konačnog volumena rezultira 20 X razrjeđenjem). Intenzitet fluorescencije svake jažice je izmjeren na STORM® sustavu (Molecular Dynamics®). Standardna krivulja je dobivena na temelju poznatih količina ribosomske RNA i rezultirajućih intenziteta fluorescencije. Koncentracija RNA u eksperimentalnim uzorcima je određena iz standardne krivulje, te ispravljena do razrjeđenja od 20X.

Reagensi i materijali:

Produkt	Kompanija	Katalog #	Skladištenje
DEPC	Sigma	D5758	4°C
EDTA	Sigma	E5134	R. T.
Trizma-baza	Sigma	T8524	R. T.
Trizma-HCl	Sigma	T7149	R. T.
Trake kolekcijske cijevi	Qiagen	19562	R. T.
RiboGreen RNA kvantifikacijski kit	Molekulska proba	R11490	-20°C/4°C
RNeasy 96 kit	Qiagen	74183	R. T.
Kvadratni jažični blokovi	Qiagen	19573	R. T.

Stvarno-vrijeme R.T.-PCR

Stvarno-vrijeme R.T.-PCR je izveden na ABI Prizma 7700 detekcijskom sustavu slijeda primjenom TaqMan EZ R.T.-PCR kita iz (Perkin-Elmer Applied Biosystems®). R.T.-PCR je optimiziran za kvantificiranje 5' IRES HCV RNA primjenom Tagman tehnologije (Roche Molecular Diagnostics Systems) slično prethodno opisanoj tehnici (Martell i sur., 1999. J.Clin.Microbiol. 37: 327-332). Sustav koristi 5'-3' nukleolitičku aktivnost AmpliTag DNA polimeraze. Ukratko, postupak koristi dvostruko označenu fluorogenu hibridizacijsku probu (PUTR Proba) koja specifično kali uzorak između PCR primera (primeri 8125 do 7028). 5' kraj probe sadrži fluorescentni odašiljač (6-karboksifluorescein [FAM]), a 3' kraj sadrži fluorescentni prigušivač (6-karboksitetrametilrodamin [TAMRA]). FAM odašiljač emisijskog spektra ugašen je prigušivačem intaktne hibridizacijske probe. Razgradnja nukleazom hibridizacijske probe otpušta odašiljač, dovodeći do porasta fluorescentne emisije. ABI Prism 7700 detektor slijeda mjeri porast fluorescentne emisije kontinuirano tijekom PCR amplifikacije na taj način da je amplificirani produkt izravno proporcionalan sa signalom.

Amplifikacijski zapis je analiziran rano u reakciji u točki koja predstavlja logaritamsku fazu nakupljanja produkta. Točka koja predstavlja definirani detekcijski prag porasta fluorescentnog signala povezanog sa eksponencijskim rastom PCR produkta za slijed detektora je definirana kao prag ciklusa (C_T). C_T vrijednosti su obrnuto proporcionalne količini unosa HCV RNA; na taj način da pod identičnim PCR uvjetima, što je veća početna koncentracija HCV RNA, niži je C_T . Standardna krivulja je konstruirana automatski putem ABI Prism 7700 detekcijskog sustava izračunavanjem C_T naspram svakog standardnog razrjeđenja poznate HCV RNA koncentracije.

Referentni uzorci za standardnu krivulju su uključeni na svakoj R.T.-PCR ploči. HCV replikon RNA je sintetiziran (putem T7 transkripcije) *in vitro*, pročišćen i kvantificiran putem OD₂₆₀. Uzimajući u obzir da 1 µg navedene RNA = 2.15×10^{11} RNA kopija, razrjeđenja su pripravljena kako bi se dobilo 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 i 10^2 kopija genomske RNA/5 µL. Ukupna stanična Huh-7 RNA je isto tako inkorporirana sa svakim razrjeđenjem (50 ng / 5 µL). 5 µL svakog referentnog standarda (HCV Replikon + Huh-7 RNA) je kombinirano sa 45 µL mješavine reagensa i korišteno u Realno-vremenskoj R.T.-PCR reakciji.

Realno-vremenska R.T.-PCR reakcija je pripremljena za eksperimentalne uzorke koji su pročišćeni na RNeasy 96-jažičnim pločama kombiniranjem 5 µl svakog ukupnog staničnog RNA uzorka sa 45 µl mješavine reagensa.

Reagensi i materijali:

Produkt	KOMPANIJA	Katalog#	Skladištenje
TagMan EZ R.T.-PCR kit	PE primjenjeni biosustavi	N808-0236	-20°C
MicroAmp Optical caps	PE primjenjeni biosustavi	N801-0935	R. T.
MicroAmp Optical 96-jažična reakcijska ploča	PE primjenjeni biosustavi	N801-0560	R. T.

Pripravljane smjese reagensa

Komponenta	Volumen po jednom uzorku (µL)	Volumen po jednoj ploči (µL) (91 uzorak + mrtvi volumen)	Konačna koncentracija
Rna za- slobodna voda	16.5	1617	
5X TaqMan EZ pufer	10	980	IX
Mn(OAc) ₂ (25 mM)	6	588	3mM
dATP (10 mM)	1.5	147	300 µM
dCTP (10 mM)	1.5	147	300 µM
dGTP (10 mM)	1.5	147	300 µM
dUTP (10 mM)	1.5	147	60 µM
Primer u smjeru (10 µM)	1	98	200 nM
Primjer obrnutog smjera (10 µM)	1	98	200 nM
PUTR proba (5 µM)	2	196	200nM
rTth DNA polimeraza (2.5 U/µL)	2	196	0.1 U/µL
AmpEaza UNG (1U/µL)	0.5	49	0.01 U/µL
Ukupni volumen	45	4410	

Slijed primer u smjeru (SEQ ID.1): 5' - ACG CAG AAA GCG TCT AGC GAT GGC GTT AGT - 3'

Slijed primera obrnutog smjera (SEQ ID. NO.2): 5' - TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG - 3'

Bilješka: Navedeni primeri amplificiraju regiju 256-nt

prisutnu unutar 5' netranslatirane regije HCV.

PUTR slijed uzorka (SEQ ID NO.3): TGG TCT GCG GAA
CCG GTG AGT AGA CC TAMRA

Kontrola bez uzorka (NTC): Na svakoj su ploči 4 jažice korištene kao «NTC». Za svaku od navedenih kontrola, dodano je u jažicu 5 pl vode umjesto RNA.

Uvjeti termalnog cikliziranja:
50°C 2 min

	60°C	30 min		
	95°C	5 min		
		95°C	15 sek	za 2 ciklusa
	60°C	1 min		
5		90°C	15 sek	za 40 ciklusa
	60°C	1 min		

Po završetku R.T.-PCR reakcije analiza podataka zahtijeva postavljanje praga fluorescentnog signala za PCR ploču i standardna krivulja je konstruirana bilježenjem Ct vrijednosti naspram broja RNA kopija korištenog u svakoj referentnoj reakciji. Dobivene Ct vrijednosti za ispitivane uzorke korištene su u interpolaciji broja RNA kopija na temelju standardne krivulje.

Naposljetku, broj kopija RNA je normaliziran (na temelju RiboGreen RNA kvantifikacije ukupne RNA ekstrahirane iz jažica sa staničnom kulturom) i izražen kao ekvivalenti genoma / μg ukupne RNA [$\text{ge}/\mu\text{g}$].

Broj kopija RNA [$\text{g.e.}/\mu\text{g}$] iz svake jažice ploče sa staničnom kulturom je mjera količine replicirajuće HCV RNA u prisustvu različitih koncentracija inhibitora. Postotak (%) inhibicije je izračunat putem slijedeće jednadžbe:

$$100 - [(g.e./\mu\text{g } inh) / (g.e./\mu\text{g } ctl) \times 100].$$

Nelinearna krivulja podešena iz Hillova modela, primjenjena je na podatke inhibicijske koncentracije, a 50% učinkovite koncentracije (EC_{50}) je izračunato primjenom SAS softvera (Statistical Software System; SAS institut, Inc. Cary, N.C.).

PRIMJER 12

Testovi specifičnosti

Testovi specifičnosti, opisani u WO 00/09543, su korišteni u procjeni selektivnosti navedenog spoja.

PRIMJER 13

Farmakokinetička svojstva

Prikazani spojevi isto tako pokazuju dobra farmakokinetička svojstva, kao što su detektabilni nivoi u plazmi kod štakora 1 sat i 2 sata nakon oralne doze od 5 mg/kg.

Točnije, korišten je test in vivo procjene oralne apsorpcije, kako bi se odredio nivo ispitivanih spojeva u plazmi, kod štakora nakon oralne primjene:

Materijali i postupci:

1. Postupak korišten kako bi se grupirali spojevi («kazetna selekcija»):

Selekcija spojeva koji će se grupirati u «kazetu» se temelji na njihovoj strukturnoj sličnosti i fizikalnokemijskim svojstvima. Uspostavljen je postupak ekstrakcije krute faze koji se može primijeniti na sve odabrane spojeve. Na osnovi početnog ispitivanja u kojem je svaki spoj unesen u plazmu štakora i proveden kroz HPLC ili HPLC/MS u koncentraciji od 0.5 μM , vrijeme retencije, ionska masa i moguće razdvajanje između spojeva putem HPLC i/ili HPLC/MS su korišteni kao osnova za grupiranje 3 do 4 spoja u jednu «kazetu».

2. Oralni vehikl i pripravljanje spoja:

Svaka «kazeta» sadrži 3 do 4 spoja u koncentraciji od 5 ili 4 mg/kg svakog spoja pojedinačno. Kazete su pripravljene u obliku oralne suspenzije u 0.5% vodenoj otopini metilceluloze i 0.3% polioksietilen (20) sorbiton monooleatu (Tween-80). Volumen doziranja je iznosio 10 mg/kg putem oralne gavaže.

3. Doziranje i uzimanje uzoraka plazme:

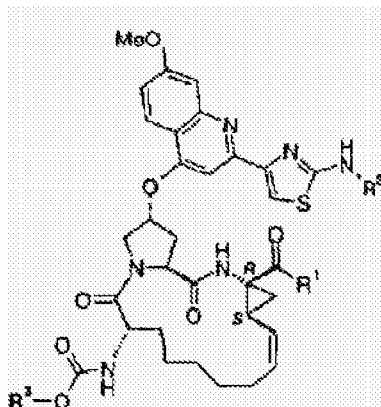
Mušjaci Sprague Dawley štakora su izgladnjeli preko noći u zasebnim kavezima, a imali su pristup 10% vodenoj otopini dekstroze. Dva štakora su dozirana sa svakom «kazetom». Uzorci plazme (-1 ml) su sakupljeni 1 i 2 sata nakon doziranja iz uzorka od dva štakora i grupirani su za ekstrakciju i analizu.

4. Ekstrakcija spoja i analiza:

Iz svake kazete, uzorci plazme od 1 i 2 sata, čiste plazme, čiste plazme sa dodatkom svih spojeva u koncentraciji od 0.5 μM svakog spoja posebno, ekstrahirani su postupkom ekstrakcije solidne faze. Uzorci su analizirani sa HPLC i

HPLC/MS zbog usporedbe. Koncentracije u plazmi su procijenjene na osnovi pojedinačne koncentracije od 0.5 μM standarda.

TABELA 1



Spoj #	R ¹	R ²	R ³	MS(M-H)-
101	OH	ciklopentil	ciklopentil	799.3
102	OH	cikloheksil	ciklopentil	813.4
103	NH-SO ₂ -ciklopropil	ciklopentil	ciklopentil	

Kada su spojevi izuma procijenjeni, prethodno navedenim enzimatskim i staničnim testovima, spojevi su se pokazali visoko učinkovitim. Točnije, spojevi su imali IC₅₀ ispod 0.01 μM u NS3-NS4A testu proteaze, a EC₅₀ ispod 0.01 μM u staničnom testu HCV RNA replikacije.

Kada su spojevi procijenjeni u testovima specifičnosti, spojevi formule I su se pokazali selektivnima time što ne uzrokuju značajnu inhibiciju u testu ljudska leukocitne elastaze i testu Katepsina B.

Kada su spojevi izloženi farmakokinetičkom testu kod štakora, doza od 5 mg/kg u Methocel:Tween20[®] (0.5%:0.3%) je dovela do neočekivano dobre koncentracije u plazmi. Spojevi 101 i 102 su pokazali površinu ispod krivulje (AUC) od 16, odnosno 18 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, u usporedbi sa njihovim najbližim analozima koji su imali AUC u rasponu od 0.8 do 4.5 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$. Navedeni neočekivani i značajan porast razine spoja u plazmi štakora, čini navedene spojeve osobito zanimljivima kao moguće lijekove za peroralnu primjenu.

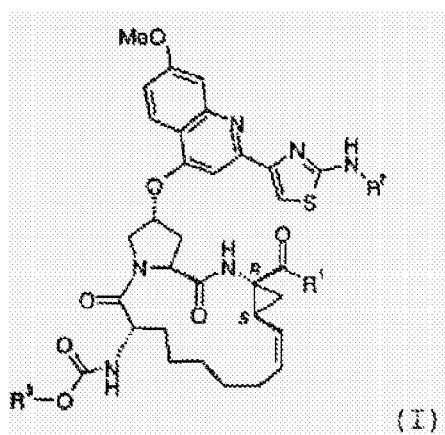
POPIS SLIJEDOVA

<110> BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.
 <120> MACROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE
 HEPATITIS C VIRUS
 <130> 13/092
 <150> 2,359,711
 <151> 2002-01-30
 <160> 3
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Forward primer
 <400> 1
 agcgagaaag cgtctcgcca tggcgtagt
 <210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Reverse primer
 <400> 2
 tccggggcca ctgcgaagca cccatcagg
 <210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PUTR probe
 <400> 3
 tggctctgcgg aaccggtagag tacact

PATENTNI ZAHTJEVI

5

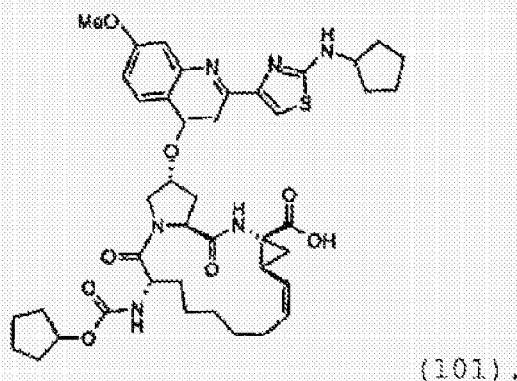
1. Spoj, **naznačen time**, da se sastoji od skupine spojeva prikazanih formulom I:



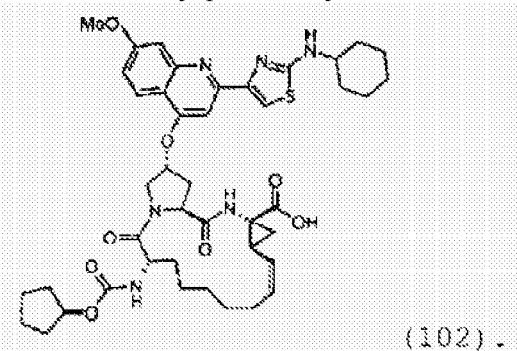
u kojoj:

R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $\{(C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil $\}$, od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, $O-(C_{1-6})$ alkilom, amido, amino ili fenilom, ili R^{1A} predstavlja C_6 ili C_{10} aril po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, (C_{1-6}) alkilom, $O-(C_{1-6})$ alkilom, amido, amino ili fenilom; R^2 predstavlja (C_{5-6}) cikloalkil, a R^3 predstavlja ciklopentil; ili njihove farmaceutski prihvatljive soli.

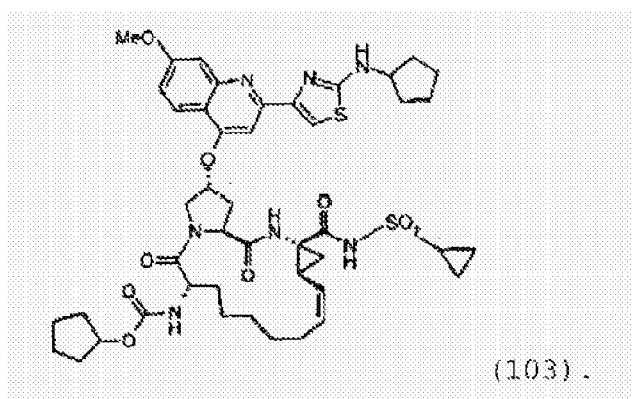
2. Spoj u skladu sa zahtjevom 1, **naznačen time**, da R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $\{(C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil $\}$, od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, nitro ili $O-(C_{1-6})$ alkilom, ili fenilom koji je po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, nitro, (C_{1-6}) alkilom ili $O-(C_{1-6})$ alkilom.
3. Spoj u skladu sa zahtjevom 2, **naznačen time**, da R^1 predstavlja NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja metil, etil, ciklopropil, ciklobutil, ciklopentil, ciklopropilmetil, cikloheksilet, CCl_3 , CF_3 , fenil, 2-fluorofenil ili 4-metilfenil.
4. Spoj u skladu sa zahtjevom 3, **naznačen time**, da R^{1A} predstavlja ciklopropil.
5. Spoj u skladu sa zahtjevom 1 ili 2, **naznačen time**, da R^1 predstavlja hidroksi.
6. Spoj u skladu sa bilo kojim od zahtjeva 1 do 5, **naznačen time**, da R^2 predstavlja ciklopentil.
7. Spoj u skladu sa zahtjevom 1, **naznačen time**, da je prikazan slijedećom formulom 101:



8. Spoj u skladu sa zahtjevom 1, **naznačen time**, da je prikazan slijedećom formulom 102:



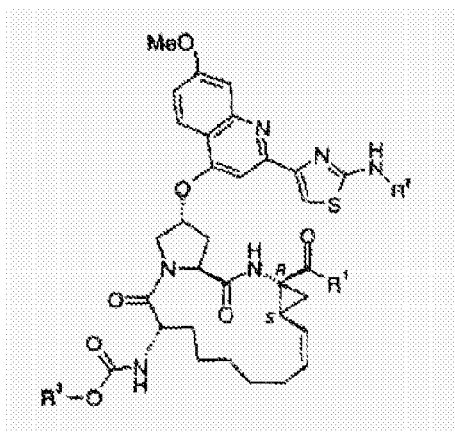
9. Spoj u skladu sa zahtjevom 1, **naznačen time**, da je prikazan slijedećom formulom 103:



10. Farmaceutski pripravak, **naznačen time**, da sadrži anti-hepatitis C virusno učinkovitu količinu spoja formule I u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 9, ili njihovu farmaceutski prihvatljivu sol, u smjesi sa farmaceutski prihvatljivim nosačem ili pomoćnim sredstvom.
11. Farmaceutski pripravak u skladu sa zahtjevom 10, **naznačen time**, da pored toga sadrži terapijski učinkovitu količinu jednog ili više drugih anti-HCV agensa.
12. Farmaceutski pripravak u skladu sa zahtjevom 11, **naznačen time**, da je drugo anti-HCV sredstvo odabrano između: α -interferona ili pegiliranog α -interferona.
13. Farmaceutski pripravak u skladu sa zahtjevom 11 ili 12, **naznačen time**, da drugo antivirusno sredstvo predstavlja ribavirin.
14. Farmaceutski pripravak u skladu sa zahtjevom 11, 12 ili 13, **naznačen time**, da je drugo anti-HCV sredstvo odabrano između inhibitora: helikaze, NS2/3 proteaze i unutarnjeg mjesta ulaska na ribosomu (IRES).
15. Postupak liječenja ili prevencije hepatitis C virusne infekcije kod sisavaca, **naznačen time**, da obuhvaća primjenu anti-hepatitis C virusno učinkovite količine spoja formule I u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 9, ili njegove farmaceutski učinkovite soli.
16. Postupak liječenja ili prevencije hepatitis C virusne infekcije kod sisavaca, **naznačen time**, da obuhvaća primjenu anti-hepatitis C virusno učinkovite količine pripravka u skladu s bilo kojim od zahtjeva 10 do 14.
17. Postupak liječenja ili prevencije hepatitis C virusne infekcije kod sisavaca, **naznačen time**, da obuhvaća primjenu anti-hepatitis C virusno učinkovite količine spoja formule I u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 9, ili njegove terapijski učinkovite soli u kombinaciji sa jednim ili više drugih anti-HCV agensom.
18. Postupak u skladu sa zahtjevom 17, **naznačen time**, da je drugi anti-HCV agens odabran između: α -interferona ili pegiliranog α -interferona.
19. Postupak u skladu sa zahtjevom 17 ili 18, **naznačen time**, da drugi anti-HCV agens predstavlja ribavirin.
20. Postupak u skladu sa zahtjevom 17, 18 ili 19, **naznačen time**, da je drugi anti-HCV agens odabran između inhibitora: helikaze, NS2/3 proteaze i inhibitora unutarnjeg mjesta ulaska na ribosomu (IRES).
21. Primjena spoja formule I u skladu sa bilo kojim od zahtjeva 1 do 9, **naznačenog time**, da je za proizvodnju lijeka za liječenje ili prevenciju hepatitis C virusne infekcije.
22. Farmaceutski pripravak u skladu sa zahtjevom 11, 12 ili 13, **naznačen time**, da drugi anti-HCV agens predstavlja inhibitor HCV polimeraze.
23. Postupak u skladu sa zahtjevom 17, 18 ili 19, **naznačen time**, da drugi anti-HCV agens predstavlja inhibitor HCV polimeraze.

SAŽETAK

Spojevi formule I:



u kojoj R^1 predstavlja hidroksi ili NHSO_2R^{1A} u kojem R^{1A} predstavlja (C_{1-6}) alkil, (C_{3-7}) cikloalkil ili $\{(C_{1-6})$ alkil- (C_{3-7}) cikloalkil $\}$, od kojih su svi po izboru supstituirani 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, $O-(C_{1-6})$ alkilom, amido, amino ili fenilom, ili R^{1A} predstavlja C_6 ili C_{10} aril po izboru supstituiran 1 do 3 puta sa halo, cijano, nitro, (C_{1-6}) alkilom, $O-(C_{1-6})$ alkilom, amido, amino ili fenilom; R^2 predstavlja (C_{5-6}) cikloalkil, a R^3 predstavlja ciklopentil; ili njihove farmaceutski prihvatljive soli, a koriste se kao inhibitori HCV NS3 proteaze.