

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 300**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 241/36 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013** **E 18215386 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020** **EP 3492464**

54 Título: **Intermedios para la preparación de inhibidores del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

03.07.2012 US 201261667806 P

15.03.2013 US 201361798524 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2021

73 Titular/es:

GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)

333 Lakeside Drive

Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

BJORNSEN, KYLA;

CANALES, EDA;

COTTELL, JEROMY, J.;

KARKI, KAPIL, KUMAR;

KATANA, ASHLEY, ANNE;

KATO, DARRYL;

KOBAYASHI, TETSUYA;

LINK, JOHN, O.;

MARTINEZ, RUBEN;

PHILLIPS, BARTON, W.;

PYUN, HYUNG-JUNG;

SANGI, MICHAEL;

SCHRIER, ADAM, JAMES;

SIEGEL, DUSTIN;

TAYLOR, JAMES, G.;

TRAN, CHINH, VIET;

TREJO MARTIN, TERESA, ALEJANDRA;

VIVIAN, RANDALL, W.;

YANG, ZHENG-YU;

ZABLOCKI, JEFF y

ZIPFEL, SHEILA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 827 300 T3

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

DESCRIPCIÓN

Intermedios para la preparación de inhibidores del virus de la hepatitis C

5 CAMPO

[0001] Se describen los inhibidores de molécula pequeña de la replicación viral, y también se dan a conocer las composiciones que contienen tales compuestos, y métodos terapéuticos que comprenden la administración de tales compuestos.

10

ANTECEDENTES

[0002] El virus de la hepatitis C (HCV), un miembro de los géneros hepacivirus dentro de la familia *Flaviviridae*, es la principal causa de enfermedad hepática crónica en todo el mundo (Boyer, N. et al. J Hepatol. 2000, 32, 98-112). En consecuencia, un enfoque significativo de la investigación antiviral actual se dirige hacia el desarrollo de métodos mejorados para el tratamiento de infecciones crónicas por VHC en humanos (Ciesek, S., von Hahn T. y Manns, MP., Clin. Liver Dis., 2011, 15, 597-609; Soriano, V. et al, J. Antimicrob. Chemother., 2011, 66, 1573-1686; Brody, H., Nature Outlook, 2011, 474, S1-S7; Gordon, CP, et al., J. Med. Chem. 2005, 48, 1-20; Maradpour, D., y col., Nat. Rev. Micro. 2007, 5, 453-463).

20

[0003] Las curas virológicas de pacientes con infección crónica por VHC son difíciles de lograr debido a la prodigiosa cantidad de producción diaria de virus en pacientes con infección crónica y la alta mutabilidad espontánea del VHC (Neumann, et al., Science 1998, 282, 103-7). ; Fukimoto, et al., Hepatology, 1996, 24, 1351-4; Domingo, et al., Gene 1985, 40, 1-8; Martell, et al., J. Virol. 1992, 66, 3225-9). El tratamiento del VHC se complica aún más por el hecho de que el VHC es genéticamente diverso y se expresa en varios genotipos diferentes y numerosos subtipos. Por ejemplo, el VHC se clasifica actualmente en seis genotipos principales (designados del 1 al 6), muchos subtipos (designados a, b, c, etc.) y alrededor de 100 cepas diferentes (numerados 1, 2, 3, etc.).

25

[0004] El VHC se distribuye en todo el mundo con los genotipos 1, 2 y 3 que predominan en Estados Unidos, Europa, Australia y Asia oriental (Japón, Taiwán, Tailandia y China). El genotipo 4 se encuentra principalmente en Oriente Medio, Egipto y África central, mientras que los genotipos 5 y 6 se encuentran predominantemente en Sudáfrica y el sudeste asiático respectivamente (Simmonds, P. et al. J Virol. 84: 4597-4610, 2010).

30

[0005] La combinación de ribavirina, un nucleósido análogo, y el interferón-alfa (α) (IFN), se utiliza para el tratamiento de múltiples genotipos de infecciones por VHC crónica en humanos. Sin embargo, la respuesta clínica variable observada en los pacientes y la toxicidad de este régimen han limitado su utilidad. La adición de un inhibidor de la proteasa del VHC (telaprevir o boceprevir) al régimen de ribavirina e IFN mejora sustancialmente las tasas de respuesta virológica de 12 semanas posteriores al tratamiento (RVS12). Sin embargo, el régimen actualmente solo está aprobado para pacientes con genotipo 1 y persisten la toxicidad y otros efectos secundarios.

40

[0006] El uso de dirigir antivirales que actúan para tratar múltiples genotipos de la infección por VHC ha demostrado ser un reto debido a la actividad variable de los antivirales contra los diferentes genotipos. Los inhibidores de la proteasa del VHC frecuentemente han comprometido la actividad *in vitro* contra los genotipos 2 y 3 del VHC en comparación con el genotipo 1 (ver, por ejemplo, la Tabla 1 de Summa, V. et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56, 4161-4167; Gottwein, J. et al, Gastroenterology, 2011, 141, 1067-1079). En consecuencia, la eficacia clínica también ha demostrado ser muy variable entre los genotipos del VHC. Por ejemplo, las terapias que son altamente efectivas contra los genotipos 1 y 2 del VHC pueden tener una eficacia clínica limitada o nula contra el genotipo 3. (Moreno, C. et al., Poster 895, 61st AASLD Meeting, Boston, MA, EE.UU., 29 de octubre - Nov. 2, 2010; Graham, F. y otros, Gastroenterology, 2011, 141, 881-889; Foster, GR et al, EASL 45th Annual Meeting, abril 14-18, 2010 Viena, Austria). En algunos casos, los agentes antivirales tienen una buena eficacia clínica contra el genotipo 1, pero menor y más variable contra los genotipos 2 y 3. (Reiser, M. et al., Hepatology, 2005, 41,832-835). Para superar la eficacia reducida en pacientes de genotipo 3, se pueden requerir dosis sustancialmente más altas de agentes antivirales para lograr reducciones sustanciales de la carga viral (Fraser, IP et al., Abstract # 48, HEP DART 2011, Koloa, HI, diciembre de 2011).

50

[0007] Agentes antivirales que son menos susceptibles a la resistencia viral también son necesarios. Por ejemplo, las mutaciones de resistencia en las posiciones 155 y 168 de la proteasa del VHC con frecuencia provocan una disminución sustancial de la eficacia antiviral de los inhibidores de la proteasa del VHC (Mani, N. Ann Forum Collab HIV Res., 2012, 14, 1-8; Romano, KP et al, PNAS, 2010, 107, 20986-20991; Lenz O, Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010, 54,1878-1887).

60

[0008] En vista de las limitaciones de la terapia actual del VHC, hay una necesidad de desarrollar terapias anti-VHC más eficaces. También sería útil proporcionar terapias que sean efectivas contra múltiples genotipos y subtipos del VHC.

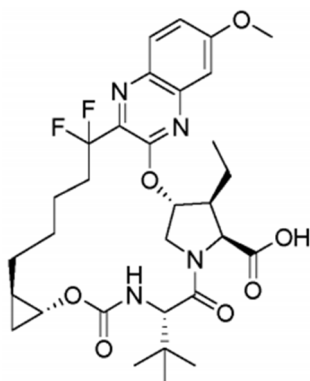
65

SUMARIO

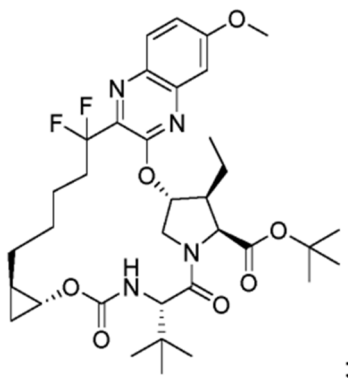
[0009] Los nuevos compuestos que inhiben el virus de la hepatitis C (HCV) NS3 proteasa se dan a conocer. En determinadas formas de realización, los compuestos descritos inhiben múltiples genotipos del virus de la hepatitis C. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de la infección por VHC y los síntomas relacionados y/o como intermedios.

[0010] Según la invención, se proporcionan:

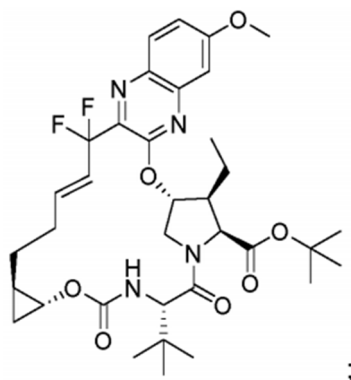
(1) un compuesto de fórmula:



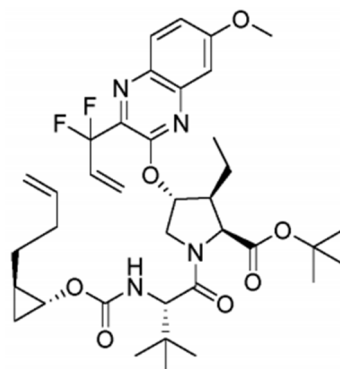
o una sal del mismo;
(2) un compuesto de fórmula:



(3) un compuesto de fórmula:



y
(4) un compuesto de fórmula:



[0011] Otras realizaciones, objetos, características y ventajas se pondrán de manifiesto en la descripción detallada de las realizaciones que siguen, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica, de la invención reivindicada. Estos objetos y ventajas se realizarán y alcanzarán mediante los procesos y composiciones señalados particularmente en la descripción escrita y las reivindicaciones de la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0012] Aunque la presente invención es capaz de ser incorporada en diversas formas, la descripción siguiente de varias realizaciones se hace con el entendimiento de que la presente descripción ha de ser considerada como una ejemplificación de la materia reivindicada. Las realizaciones ilustradas bajo cualquier encabezado pueden combinarse con las realizaciones ilustradas bajo cualquier otro encabezado.

Abreviaturas

[0013] Las siguientes abreviaturas se usan en toda la memoria, y tienen los siguientes significados:

°C = grados Celsius
 A = Angstrom
 Ac = acetilo
 AcOH = ácido acético
 aq = acuoso
 Ar = argón
 atm = atmósfera
 BEP = 2-bromo-1-etilo piridinio tetrafluoroborato Bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II)dicloruro
 Bn = bencilo
 Boc = *tert*-butoxi carbonilo
 Boc₂O = di-*tert*-butilo dicarbonato
 pe = punto de ebullición
 Bs = 4-bromofenilsulfonilo
 Bu = butilo
 calc = calculado
 CBS = Corey-Bakshi-Shibata
 CBZ = Cbz = carboxibencilo
 CDI = 1,1'-carbonildiimidazol
 cm = centímetro
 COMU = (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio hexafluorofosfato
 DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
 DBU = 1,8-diazabicycloundec-7-eno
 DCE = 1,2-dicloroetano
 DCM = diclorometano
 DDQ = 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
 DIAD = azodicarboxilato de diisopropilo
 dioxano = 1,4-dioxano
 DIPEA = *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina
 DMF = *N,N*-dimetilformamida
 DMAP = 4-dimetilaminopiridina
 DMPU = 1,3-dimetilo-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona
 DMSO = dimetilsulfóxido
 dppf = 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno
 DSC = *N,N'*-disuccinimidilo carbonato
 EA = EtOAc = acetato de etilo

	CE ₅₀ = concentración media máxima efectiva
	EDC = 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo)carbodiimida
	Et = etilo
	Et ₂ O = éter dietílico
5	EtOAc = acetato de etilo
	EtOH = etanol
	equiv = equivalente
	F-NMR = espectroscopia de resonancia magnética nuclear de flúor
	g = gramo
10	h = hr = hora
	HATU = O-(7-azabenzotriazol-1-ilo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio Hexafluorofosfato
	VHC = virus de la hepatitis C
	HEPES = ácido hidroxietilpiperazineetanosulfónico
	Hex = hex = hexanos
15	HMDS = hexametildisilazano(azida)
	HMPA = hexametilfosforamida
	¹ H-RMN = espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones
	HOAc = ácido acético
	HOBT = hidroxibenzotriazol
20	HPLC = cromatografía líquida de alta presión
	Hz = Hertz
	IPA = alcohol isopropílico
	i = iso
	J = constante de acoplamiento
25	KHMDS = Bis(trimetilsililo)amida de potasio
	L = litro
	LCMS-ESI ⁺ = espectrómetro de masas de cromatografía líquida (ionización por electrospray)
	LiHMDS = litio Bis(trimetilsililo)amida
	M = concentración molar (mol/L)
30	<i>m</i> CPBA = <i>meta</i> -ácido cloroperoxibenzoico
	Me = metilo
	MeCN = ACN = acetonitrilo
	MeOH = metanol
	MeTHF = 2-metiltetrahidrofurano
35	mg = miligramo
	MHz = mega Hertz
	mL = mililitro
	mmol = milimol
	min = minuto
40	MTBE = metilo terc-butiléter
	Ms = metanosulfonilo
	MsCl = cloruro de metanosulfonilo
	MS = tamices moleculares
	MSA = ácido metilsulfónico
45	n = normal
	N = concentración normal
	NCS = N-clorosuccinimida
	NMM = N-metilmorfolina
	NMO = <i>N</i> -metilmorpholine- <i>N</i> -óxido
50	NMP = <i>N</i> -metilpirrolidinona
	o/n = durante la noche
	PCR = reacción en cadena de la polimerasa
	Pf = 9-fenilo-9H-fluoren-9-ilo
	PG = grupo protector
55	PE = éter de petróleo
	Ph = fenilo
	PhMe = tolueno
	pM = picomolar
	PMB = 4-metoxibencilo
60	Pr = propilo Pd(dppf)Cl ₂ = PdCl ₂ (dppf) = PdCl ₂ dppf = (1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno)dicloropaladio(II)
	PPh ₃ = trifenilfosfina
	TiempoRet = tiempo de retención
	ta = temperatura ambiente
	sat = sat. = saturado
65	sec = secundario
	S _N 1 = sustitución nucleofílica unimolecular

S_N2 = sustitución nucleofílica bimolecular
 S_NAr = sustitución nucleofílica aromática
 t = terc = terciario
 TBAF = tetra-*n*-fluoruro de butilamonio
 TBS = TBDMS = *tert*-butildimetilsililo
 TBTU = O-(benzotriazol-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrafluoroborato de tetrametiluronio
 TEA = trietilamina
 temp = temperatura
 TEMPO = (2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-ilo)óxido
 Tf = trifluorometanosulfonilo
 TFA = ácido trifluoroacético
 THF = tetrahidrofurano
 TIPS = triisopropilsililo
 TLC = cromatografía en capa fina
 TMS = trimetilsililo
 TMSOTf = trifluorometanosulfonato de trimetilsililo
 TPAP = perrutenato de tetrapropilamonio
 Tr = trifenilmetilo
 Ts = *para*-toluenosulfonilo
 p = peso
 p/p = relación de peso/peso

Definiciones

[0014] A menos que se indique lo contrario, frases como se usan en este documento pretenden tener los siguientes significados:

Cuando un grupo cíclico (*p. ej.*, cicloalquilo, carbociclilo, carbociclilo bicíclico, heteroarilo, heterociclilo) se encuentra limitado por un número o rango de números, el número o números se refieren al número de átomos que componen el grupo cíclico, incluyendo cualquier heteroátomo. Por tanto, por ejemplo, un grupo heterociclilo de 4-8 miembros tiene 4, 5, 6, 7 u 8 átomos en el anillo.

[0015] "Alquenilo" se refiere a un hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada con al menos un sitio de insaturación, por ejemplo, un doble enlace (sp^2)carbono- (sp^2) carbono. Por ejemplo, un grupo alquenilo puede tener de 2 a 8 átomos de carbono (es decir, C_2 - C_8 alquenilo), o de 2 a 6 átomos de carbono (es decir, C_2 - C_6 alquenilo). Los ejemplos de grupos alquenilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, etileno o vinilo ($-CH=CH_2$) y alilo ($-CH_2CH=CH_2$).

[0016] "Alquenileno" se refiere a un alqueno que tiene dos centros monovalentes radicales derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los mismos o de dos átomos de carbono diferentes de un alqueno original. Ejemplos de radicales alquenileno incluyen, pero no se limitan a, 1,2-etenileno ($-CH=CH-$) o prop-1-enileno ($-CH_2CH=CH-$).

[0017] "Alcoxi" es RO- donde R es alquilo, como se define aquí. Los ejemplos no limitantes de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi y propoxi.

[0018] "Alquilo" se refiere a un radical hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada saturada. Por ejemplo, un grupo alquilo puede tener de 1 a 8 átomos de carbono (es decir, (C_1-C_8) alquilo) o de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, (C_1-C_6) alquilo) o de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de grupos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo.

[0019] "Alquileno" se refiere a un alquilo que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Ejemplos de radicales alquileno incluyen, pero no se limitan a, metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$) y butileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$).

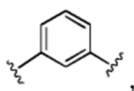
[0020] "Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada con al menos un sitio de insaturación, por ejemplo, un triple enlace de (sp) carbono- (sp) carbono. Por ejemplo, un grupo alquinilo puede tener de 2 a 8 átomos de carbono (C_2 - C_8 alquino) o de 2 a 6 átomos de carbono (C_2 - C_6 alquinilo). Ejemplos de grupos de alquinilo incluyen, pero no se limitan a, grupos de acetileno ($-C\equiv CH$) y propargilo ($-CH_2C\equiv CH$).

[0021] "Alquinileno" se refiere a un alquinilo que tiene dos centros monovalentes radicales derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alquino progenitor. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero no se limitan a, acetileno ($-C\equiv C-$), propargileno ($-CH_2C\equiv C-$) y 1-pentinileno ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv C-$).

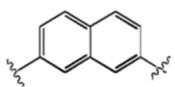
[0022] "Arilo" se refiere a un único anillo aromático todo de carbono o un sistema condensado de anillo todo de carbono múltiple (*p. ej.*, un sistema de anillo fusionado de anillos multicíclicos) en donde al menos uno de los anillos es aromático. Por ejemplo, un grupo arilo puede tener de 6 a 20 átomos de carbono, de 6 a 14 átomos de carbono o de

6 a 12 átomos de carbono. Debe entenderse que el punto de unión de un sistema de anillo condensado múltiple, como se definió anteriormente, puede estar en cualquier posición del sistema de anillo que incluye una porción aromática o de carbociclilo del anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo e indanilo.

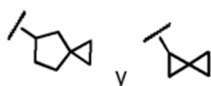
[0023] "Arleno" se refiere a un arilo como se define aquí que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono diferentes de un arilo de los padres. Radicales de arileno típicos incluyen, pero no se limitan a, fenileno, p. ej.,



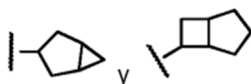
y naftileno, p. ej.,



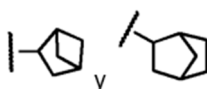
[0024] "Carbociclilo bicíclico" se refiere a un hidrocarburo de anillo espiro de 5-14 miembros saturado o parcialmente insaturado bicíclico fusionado, en puente, o unido a través de un anillo de carbono. En un carbociclilo espiro bicíclico, los dos anillos comparten un solo átomo de carbono común. En un carbociclilo bicíclico fusionado, los dos anillos comparten dos átomos de carbono comunes y adyacentes. En un carbociclilo bicíclico con puente, los dos anillos comparten tres o más átomos de carbono no adyacentes comunes. Ejemplos de grupos carbociclilo bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, grupos carbociclilo espiro bicíclicos en los que dos anillos carbociclilo comparten un átomo común (p. ej.



), grupos carbociclilo bicíclicos fusionados en los que dos anillos carbociclilo comparten dos átomos comunes (p. ej.

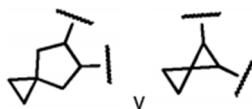


), y grupos carbociclilo bicíclicos puenteados en los que dos anillos de carbociclilo comparten tres o más (como 3, 4, 5 o 6) átomos comunes (p. ej.

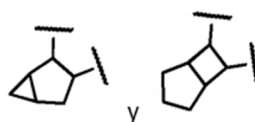


).

[0025] "Carbociclileno bicíclico" se refiere a un carbociclilo bicíclico, tal como se define anteriormente, que tiene dos centros radicales monovalentes de derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un carbociclilo bicíclico padre. Los ejemplos de grupos carbociclileno bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, grupos carbociclileno espiro bicíclicos en los que dos anillos carbociclilo comparten un átomo común (p. ej.



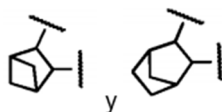
), grupos carbociclileno bicíclicos fusionados en los que dos anillos carbociclilo comparten dos átomos comunes (p. ej.



), y grupos carbociclileno bicíclicos puenteados donde dos anillos carbociclilo comparten tres o más (tales como 3, 4,

5 o 6) átomos comunes (p. ej.

5



).

10 **[0026]** "Carbociciloxi" es RO- donde R es carbocicilo, tal como se define en el presente documento.

[0027] "Carbociciloxi bicíclico" es RO- donde R es carbocicilo bicíclico, tal como se define en el presente documento.

15 **[0028]** "Carbocicilo", y "carbociclo" se refieren a un grupo hidrocarbilo que contiene una estructura de anillo saturada o parcialmente insaturada, unida a través de un carbono del anillo. En diversas realizaciones, carbocicilo se refiere a un resto cíclico C₃-C₁₂ saturado o parcialmente insaturado, cuyos ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

20 **[0029]** "Carbocicileno" (así como "carbociclono") se refiere a un carbocicilo, tal como se define en el presente documento, que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un carbocicilo padre. Los ejemplos de carbocicleno incluyen, pero no se limitan a, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno y ciclohexileno.

25 **[0030]** "Carbocicilalquilo" se refiere a un grupo hidrocarbilo que contiene una estructura de anillo saturada o parcialmente insaturada, unida a un grupo alquilo, unida a través de un carbono del anillo o un carbono de alquilo. En diversas realizaciones, carbocicilalquilo se refiere a un resto carbocicilalquilo C₇-C₁₂ saturado o parcialmente insaturado, cuyos ejemplos incluyen ciclopropilalquilo, ciclobutilalquilo, ciclopropilalquilo y ciclopropilpropilo.

30 **[0031]** "Carbocicilalquilenno" se refiere a un carbocicilalquilo, tal como se define en el presente documento, que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un cicloalquilalquilo padres. Los ejemplos de cicloalquileno incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilmetileno y ciclopropilmetileno.

35 **[0032]** "Cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarbilo que contiene una estructura de anillo saturada, unida a través de un carbono del anillo. En diversas realizaciones, cicloalquilo se refiere a un resto cíclico C₃-C₁₂ saturado, ejemplos del cual incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

[0033] "Cicloalcoxi" es RO- donde R es cicloalquilo, ya definidos antes.

40 **[0034]** "Enlace directo" se refiere un enlace covalente entre dos átomos.

[0035] "Halo" o "halógeno" se refiere a cloro (-Cl), bromo (Br), flúor (-F) o yodo (-I).

45 **[0036]** "Haloalqueno" se refiere a alqueno de grupo, como se define aquí, sustituido con uno o más átomos de halógeno.

[0037] "Haloalcoxi" se refiere a alcoxi, como se define aquí, sustituido con uno o más átomos de halógeno.

50 **[0038]** "Haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo, en el que uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo se ha reemplazado con un átomo de halógeno. Los ejemplos de grupos haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, -CF₃, -CHF₂, -CFH₂ y -CH₂CF₃.

[0039] "Haloalquilenno" se refiere a grupo alquilenno, como se define aquí, sustituido con uno o más átomos de halógeno.

55 **[0040]** "Heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se definen en el presente documento, en el que uno o más átomos de carbono se reemplaza con un átomo de oxígeno, azufre o átomo de nitrógeno.

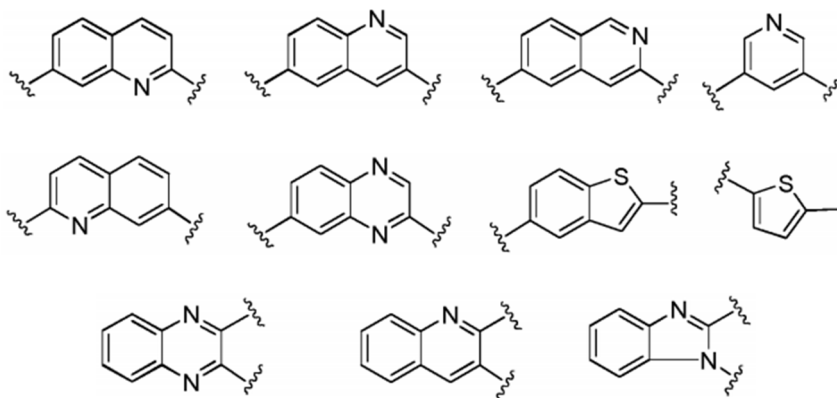
[0041] "Heteroalquilenno" se refiere a un grupo alquilenno, como se definen en el presente documento, en el que uno o más átomos de carbono se sustituye con un átomo de oxígeno, azufre o átomo de nitrógeno.

60 **[0042]** "Heteroalqueno" se refiere a un grupo alqueno, como se define en el presente documento, en el que uno o más átomos de carbono se sustituye con un átomo de oxígeno, azufre o átomo de nitrógeno.

65 **[0043]** "Heteroalquilenno" se refiere al grupo heteroalquilenno, como se ha definido anteriormente, que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos diferentes de un grupo heteroalquilenno padre.

[0044] "Heteroarilo" se refiere a un único anillo aromático que tiene al menos un átomo distinto de carbono en el anillo, en el que el átomo se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre; el término también incluye múltiples sistemas de anillos condensados que tienen al menos uno de tales anillos aromáticos. Por ejemplo, heteroarilo incluye un anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico que tiene hasta 6 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático y contiene de 1 a 4 heteroátomos en el anillo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los anillos del sistema de anillos condensados múltiples se pueden conectar entre sí mediante enlaces fusionados, espiro y puenteados cuando lo permitan los requisitos de valencia. Los ejemplos no limitativos de heteroarilo incluyen piridilo, tienilo, furanilo, pirimidilo, imidazolilo, piranilo, pirazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirrolilo, piridazinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, dibenzotiofenilo, benzotienilo, indolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, bencimidazolilo, isoindolilo, benzotriazolilo, purinilo, tianafteñilo y pirazinilo. La unión de heteroarilo puede ocurrir a través de un anillo aromático o, si el heteroarilo es bicíclico o tricíclico y uno de los anillos no es aromático o no contiene heteroátomos, a través de un anillo no aromático o un anillo que no contiene heteroátomos. También se entiende que "heteroarilo" incluye el derivado de N-óxido de cualquier heteroarilo que contiene nitrógeno.

[0045] "Heteroarileno" se refiere a un heteroarilo, como se define anteriormente, que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes o la eliminación de un hidrógeno de un solo átomo de carbono y la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de nitrógeno de un grupo heteroarilo original. Ejemplos no limitantes de grupos heteroarileno son:



[0046] "Heterociclilo" se refiere a un anillo monocíclico saturado o parcialmente insaturado, grupo bicíclico o tricíclico de 2 a 14 átomos de anillo-carbono y, además de átomos de anillo-carbono, de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los grupos heterociclilo bi- o tricíclicos pueden tener conectividad de anillo fusionado, puenteado o espiro. En diversas realizaciones, el grupo heterociclilo está unido a otro resto a través de carbono o mediante un heteroátomo. Los ejemplos de heterociclilo incluyen, sin limitaciones, azetidino, oxazolinilo, isoxazolinilo, oxetanilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidroisoquinolinilo, 1,4-dioxanilo, pirrolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidino, metilendioxi-benzoílo, cromanilo, dihidropiranoquinoxalinilo, tetrahidroquinoxalinilo, tetrahidroquinolinilo, dihidropiranoquinolinilo y tetrahidrotienilo y N-óxidos de los mismos. Un grupo heterociclilo espiro bicíclico se refiere a un grupo heterociclilo bicíclico en el que los dos anillos del grupo heterociclilo bicíclico comparten un átomo común. Un grupo heterociclilo bicíclico bicíclico condensado se refiere a un grupo heterociclilo bicíclico en el que los dos anillos del grupo heterociclilo bicíclico comparten dos átomos comunes. Un grupo heterociclilo bicíclico con puente se refiere a un grupo heterociclilo bicíclico en el que los dos anillos del grupo heterociclilo bicíclico comparten tres o más (tales como 3, 4, 5 o 6) átomos comunes.

[0047] "Heterociclino" se refiere a un heterociclilo, tal como se define en el presente documento, que tiene dos centros radicales monovalentes derivado de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes, a través de un carbono y un heteroátomo, o por medio de dos heteroátomos de una heterociclo padre.

[0048] "Profármaco" se refiere a cualquier compuesto que cuando se administra a un sistema biológico genera la sustancia farmacéutica, o un ingrediente activo, como resultado de la(s) reacción(es) química(s) espontánea(s), reacción(es) química(s) catalizadoras de enzimas, fotólisis, y/o reacción(es) química(s) metabólica(s). Por tanto, un profármaco es un análogo modificado covalentemente o una forma latente de un compuesto terapéuticamente activo. Los ejemplos no limitantes de profármacos incluyen restos de éster, restos de amonio cuaternario, restos de glicol y similares.

[0049] El término "opcionalmente sustituido" se refiere a un resto en el que todos los sustituyentes son hidrógeno o en donde uno o más de los hidrógenos de la fracción se sustituyen por sustituyentes que no son hidrógeno; es decir, el resto que está opcionalmente sustituido está sustituido o no sustituido.

[0050] "Grupo saliente" (GS) se refiere a un resto de un compuesto que es activo hacia el desplazamiento o sustitución en una reacción química. Entre los ejemplos en los que se produce el desplazamiento o la sustitución se incluyen, pero no se limitan a, sustitución bimolecular nucleofílica (S_N2), sustitución unimolecular nucleofílica (S_N1), sustitución aromática nucleofílica (S_NAr) y acoplamientos cruzados catalizados por metales de transición. Los ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a, un átomo de halógeno (p. ej., -Cl, -Br, -I) y sulfonatos (p. ej., mesilato (-OM), tosilato (-OT) o triflato (-OTf)). El experto en la materia conocerá varios grupos salientes químicos y estrategias para la activación y apreciará el resto apropiado que actuará como grupos salientes, según la reacción química particular, la funcionalidad a la que está unido el grupo y los reactivos químicos utilizados para afectar la reacción de desplazamiento o sustitución. Como ejemplo no limitante, en algunas situaciones, un átomo de halógeno (p. ej., -Cl, -Br o -I) sirve como grupo saliente en una reacción catalizada por un metal de transición (p. ej., acoplamiento de Suzuki catalizado por Pd entre un haluro de arilo y ácido arilo borónico) y otros reactivos como una base.

Estereoisómeros

[0051] Definiciones y convenciones usadas en este documento generalmente siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; and Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

[0052] El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse de la imagen de espejo socio, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se pueden superponer en su compañero de imagen especular.

[0053] "Isómeros" son compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular. Los isómeros incluyen estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros.

[0054] Los "diastereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí.

[0055] Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término "(±)" se usa para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado.

[0056] El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

[0057] Los compuestos descritos en este documento pueden tener centros quirales, por ejemplo, átomos de carbono quirales. Por tanto, tales compuestos incluyen mezclas racémicas de todos los estereoisómeros, incluidos enantiómeros, diastereómeros y atropisómeros. Además, los compuestos descritos en este documento incluyen isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o en todos los átomos quirales asimétricos. En otras palabras, los centros quirales evidentes a partir de las representaciones se proporcionan como isómeros quirales o mezclas racémicas. Tanto las mezclas racémicas como las diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales aislados o sintetizados, sustancialmente libres de sus compañeros enantioméricos o diastereoméricos, están todos dentro del alcance de la invención. Las mezclas racémicas se pueden separar en sus isómeros individuales sustancialmente ópticamente puros mediante técnicas bien conocidas como, por ejemplo, la separación de sales diastereoisómeras formadas con adyuvantes ópticamente activos, por ejemplo, ácidos o bases, seguida de la conversión de nuevo a las sustancias ópticamente activas. El isómero óptico deseado también se puede sintetizar mediante reacciones estereoespecíficas, comenzando con el estereoisómero apropiado del material de partida deseado.

[0058] Se ha de entender que para compuestos descritos aquí cuando un enlace se dibuja de una manera no-estereoquímica (p. ej., plana) el átomo al que está unido el enlace incluye todas las posibilidades estereoquímicas. También debe entenderse que cuando se dibuja un enlace de una manera estereoquímica (p. ej., en negrita, en negrita, discontinua o discontinua) el átomo al que está unido el enlace estereoquímico tiene la estereoquímica como se muestra a menos que se indique lo contrario. Por consiguiente, en una realización, un compuesto descrito en este documento es más del 50% de un solo enantiómero. En otra realización, un compuesto descrito en este documento es al menos un 80% de un enantiómero único. En otra realización, un compuesto descrito en este documento es al menos el 90% de un enantiómero único. En otra realización, un compuesto descrito en el presente documento es al menos un 98% de un enantiómero único. En otra realización, un compuesto descrito en este documento es más del 50% de un solo diastereómero. En otra realización, un compuesto descrito en este documento es al menos un 80% de un solo diastereómero. En otra realización, un compuesto descrito en el presente documento es al menos un 98% de un solo

diastereómero. En otra realización, un compuesto descrito en este documento es al menos un 99% de un solo diastereómero.

Tautómeros

[0059] Los compuestos descritos en este documento también pueden existir como isómeros tautómeros en ciertos casos. Aunque sólo se puede representar una estructura de resonancia deslocalizada, todas estas formas se contemplan dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, pueden existir tautómeros eno-amina para sistemas de purina, pirimidina, imidazol, guanidina, amidina y tetrazol y todas sus posibles formas tautoméricas están dentro del alcance de la invención.

Isótopos

[0060] Los expertos en la técnica entenderán que esta invención también incluye cualquier compuesto reivindicado que pueda estar enriquecido en cualquiera o en todos los átomos por encima de las proporciones isotópicas naturales con uno o más isótopos tales como, pero no limitado a, deuterio (^2H o D). Como ejemplo no limitativo, un grupo $-\text{CH}_3$ puede reemplazarse por $-\text{CD}_3$.

[0061] Los valores específicos enumerados a continuación para radicales, sustituyentes e intervalos son sólo para ilustración; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de rangos definidos para los radicales y sustituyentes.

Grupos protectores

[0062] En ciertas realizaciones, los grupos protectores incluyen restos de profármaco y los grupos protectores químicos. Los grupos protectores pueden estar representados por la abreviatura "PG".

[0063] "Grupo protector" ("PG") se refiere a un resto de un compuesto que enmascara o altera las propiedades de un grupo funcional o las propiedades del compuesto como un todo. Los grupos protectores químicos y las estrategias de protección/desprotección son bien conocidos en la técnica. Ver p. ej. Peter G. M. Wuts y Theodora W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4ª edición; John Wiley & Sons, Inc.: Nueva Jersey, 2007. Véase también Kocienski, P.J. *Protecting Groups*, 3ª edición; Georg Thieme Verlag Stuttgart: Nueva York, 2005, en particular el Chapter 1, *Protecting Groups: An Overview*, páginas 1-48, Chapter 2, *Carbonyl Protecting Groups*, páginas 49-118, Capítulo 3, *Diol Protecting Groups*, páginas 119-186, Capítulo 4, *Hydroxyl Protecting Groups*, páginas 187-364, Capítulo 5, *Thiol Protecting Groups*, páginas 365-392. Los grupos protectores se utilizan a menudo para enmascarar la reactividad de ciertos grupos funcionales, para ayudar en la eficiencia de las reacciones químicas deseadas, por ejemplo, para formar y romper enlaces químicos de una manera ordenada y planificada.

[0064] La protección de los grupos funcionales de un compuesto altera otras propiedades físicas además de la reactividad del grupo funcional protegido, como la polaridad, la lipofiliidad (hidrofobicidad) y otras propiedades que se pueden medir con herramientas analíticas comunes. Los intermedios químicamente protegidos pueden ser ellos mismos biológicamente activos o inactivos.

[0065] En ciertas realizaciones, los grupos protectores se emplean opcionalmente para prevenir las reacciones secundarias con el grupo protegido durante los procedimientos sintéticos. La selección de los grupos apropiados para proteger, cuándo hacerlo, y la naturaleza del grupo protector químico "PG" depende de la química de la reacción contra la que se protege (p. ej., condiciones ácidas, básicas, oxidativas, reductoras u otras) y la dirección prevista de la síntesis. Los PG no necesitan ser, y generalmente no lo son, los mismos si el compuesto se sustituye con múltiples PG. En general, PG se utilizará para proteger grupos funcionales tales como grupos carboxilo, hidroxilo, tio o amino y para prevenir así reacciones secundarias o para facilitar de otro modo la eficacia sintética. El orden de desprotección para producir grupos desprotegidos libres depende de la dirección pretendida de la síntesis y las condiciones de reacción que se encontrarán, y puede ocurrir en cualquier orden según lo determine el experto.

Sales e hidratos

[0066] Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento incluyen sales derivadas de una base apropiada, tal como un metal alcalino (p. ej., sodio), un metal alcalinotérreo (p. ej., magnesio), amonio y NX_4^+ (donde X es C_1 - C_4 alquilo). Las sales farmacéuticamente aceptables de un átomo de nitrógeno o un grupo amino incluyen, por ejemplo, sales de ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácidos acético, benzoico, láctico, fumárico, tartárico, maleico, malónico, málico, isetiónico, lactobiónico y succínico; ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico y p-toluenosulfónico; y ácidos inorgánicos, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y sulfámico. Las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto de un grupo hidroxilo incluyen el anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como Na^+ y NX_4^+ (en el que cada X se selecciona independientemente entre H o un grupo C_1 - C_4 alquilo).

[0067] Para uso terapéutico, las sales de los ingredientes activos de los compuestos descritos en el presente

documento normalmente serán farmacéuticamente aceptables, es decir, serán sales derivadas de un ácido o base fisiológicamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos o bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto de la invención u otro compuesto descrito en este documento. Todas las sales, sean o no derivadas de un ácido o base fisiológicamente aceptable, están dentro del alcance de la presente invención.

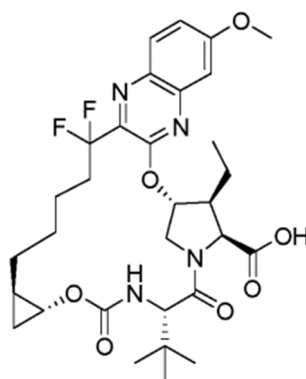
[0068] Las sales metálicas típicamente se preparan haciendo reaccionar el hidróxido metálico con un compuesto descrito en este documento. Ejemplos de sales metálicas que se preparan de esta manera son sales que contienen Li^+ , Na^+ y K^+ . Puede precipitarse una sal metálica menos soluble a partir de la solución de una sal más soluble mediante la adición del compuesto metálico adecuado.

[0069] Además, se pueden formar sales de adición de ácido de ciertos ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl , HBr , H_2SO_4 , H_3PO_4 o ácidos sulfónicos orgánicos, a los centros básicos, tales como aminas. Finalmente, debe entenderse que las composiciones de la presente comprenden compuestos descritos en la presente memoria en su forma no ionizada, así como de ion híbrido, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua como en hidratos.

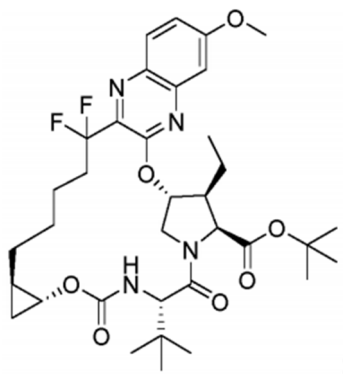
Formas de realización

[0070] Se proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

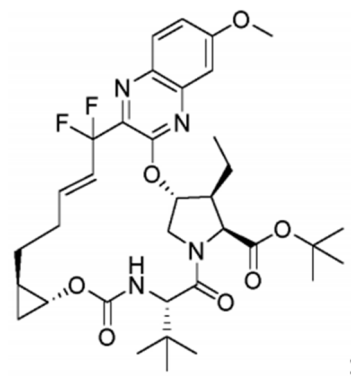
(1) un compuesto de fórmula:



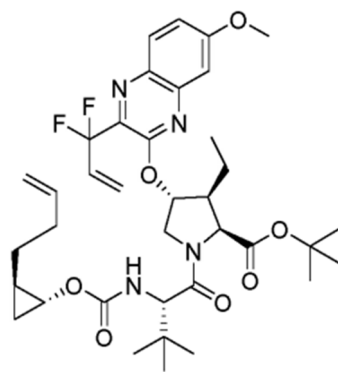
o una sal del mismo;
(2) un compuesto de fórmula:



(3) un compuesto de fórmula:



y
(4) un compuesto de fórmula:



Procedimientos de tratamiento

[0071] En este documento se describen usos de los compuestos de la invención en:

un método para tratar una infección viral por *Flaviviridae* (p. ej., una infección viral por VHC) en un paciente que lo necesite (p. ej., un mamífero tal como un ser humano). El método incluye administrar el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al paciente.

un método para inhibir la proliferación del virus del VHC, tratar la infección por el VHC o retrasar la aparición de los síntomas del VHC en un paciente que lo necesite (p. ej., un mamífero como un ser humano). El método incluye administrar el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al paciente.

terapia médica (p. ej., para su uso en el tratamiento de una infección viral de *Flaviviridae* (p. ej., una infección viral del VHC) o la proliferación del virus HCV o retrasar la aparición de los síntomas del VHC en un paciente (p. ej., un mamífero tal como un ser humano).

la fabricación de un medicamento para tratar una infección viral *Flaviviridae* (p. ej., una infección viral del VHC) o la proliferación del virus HCV o retrasar la aparición de los síntomas del VHC en un paciente en necesidad del mismo (p. ej., mamífero tal como un humano).

el tratamiento profiláctico o terapéutico de la proliferación de un virus de *Flaviviridae*, un virus HCV o para uso en el tratamiento terapéutico de retrasar la aparición de los síntomas del VHC.

el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por el virus *Flaviviridae* (p. ej., una infección por el virus VHC).

la fabricación de un medicamento para una infección por el virus *Flaviviridae* (p. ej., una infección por el virus del VHC) en un mamífero (p. ej., un ser humano).

un método para tratar la infección crónica por hepatitis C. El método incluye la administración del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al paciente.

un método para tratar la infección por hepatitis C en pacientes sin tratamiento previo. El método incluye administrar a un paciente sin tratamiento previo, el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

un método para tratar la infección por hepatitis C en pacientes con experiencia en tratamientos. El método incluye administrar a un paciente con experiencia en el tratamiento, el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

se proporciona un método para tratar la infección por hepatitis C en un paciente no apto para interferón o intolerante al interferón. El método incluye administrar el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al paciente.

[0072] En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en el presente documento incluyen la administración del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente por un período fijo de duración. En algunas realizaciones, el período fijo de duración es de 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o 12 semanas. En otras realizaciones, el período fijo de duración no supera las 12 semanas.

[0073] En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante aproximadamente 12 semanas. En realizaciones adicionales, el compuesto se administra durante aproximadamente 12 semanas o menos, durante aproximadamente 10 semanas o menos, durante aproximadamente 8 semanas o menos, durante aproximadamente 6 semanas o menos, o durante aproximadamente 4 semanas o menos.

[0074] El compuesto se puede administrar una vez al día, dos veces al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces por semana o cinco veces por semana.

[0075] En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en el presente documento incluye la administración del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a los pacientes infectados con VHC de genotipo (GT) 1, 2, 3, 4, 5, o 6 (es decir, un método para el tratamiento de una infección por VHC GT 1, 2, 3, 4, 5 o 6).

[0076] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 1.

[0077] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 2.

[0078] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 3.

[0079] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 4.

[0080] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 5.

[0081] En una realización, el paciente está infectado con VHC genotipo 6.

[0082] En los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la etapa de administración incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente que necesita tratamiento.

[0083] Se describen métodos para inhibir la actividad de HCV. Dichos métodos incluyen la etapa de tratar una muestra que se sospecha que contiene VHC con un compuesto o composición descritos en este documento.

[0084] En una realización, los compuestos descritos en el presente documento actuar como inhibidores de VHC, como intermedios para tales inhibidores o tienen otras utilidades como se describe a continuación.

[0085] En ciertas realizaciones, los compuestos de unión en el hígado se pueden unir con diferentes grados de reversibilidad.

[0086] Un método para el tratamiento de HCV puede incluir la adición de un compuesto dado a conocer en el presente documento a la muestra. La etapa de adición comprende cualquier método de administración como se describió anteriormente.

[0087] Si se desea, la actividad de VHC después de la aplicación del compuesto se puede observar por cualquier método incluyendo métodos directos e indirectos de detección de la actividad de VHC. Se contemplan todos los métodos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos para determinar la actividad del VHC. Normalmente se aplica uno de los métodos de detección descritos anteriormente, sin embargo, también es aplicable cualquier otro método, como la observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo.

[0088] Muchos organismos contienen HCV. Los compuestos de esta invención son útiles en el tratamiento o la profilaxis de afecciones asociadas con la activación del VHC en animales o en humanos.

Formulaciones farmacéuticas

[0089] "Farmacéuticamente aceptable" significa adecuado para su uso en preparaciones farmacéuticas, generalmente considerado como seguro para tal uso, aprobado oficialmente por una agencia reguladora de un gobierno nacional o estado para tal uso, o ser indicado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

[0090] "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo, u otro ingrediente que es farmacéuticamente aceptable y con el que se administra un compuesto de la invención.

[0091] Los compuestos de esta invención se formulan con vehículos convencionales (p. ej., ingrediente inactivo o material excipiente), que serán seleccionados en conformidad con la práctica ordinaria. Los comprimidos contendrán excipientes que incluyen deslizantes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril, y cuando se pretenden administrar mediante una administración distinta a la oral, generalmente serán isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes tales como los expuestos en Handbook of Pharmaceutical Excipients (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes como EDTA, carbohidratos como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmethylcelulosa, ácido esteárico y similares. Una realización proporciona la formulación como una forma de dosificación sólida que incluye una forma de dosificación oral sólida. El pH de las formulaciones varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero ordinariamente es de aproximadamente 7 a 10.

[0092] Si bien es posible que los ingredientes activos se administren solos puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas (composiciones). Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la invención comprenden al menos un ingrediente activo, como se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables para el mismo y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el receptor de los mismos.

[0093] Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones se encuentran generalmente en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con ingredientes inactivos (p. ej., un vehículo, excipiente farmacéutico, etc.) que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

[0094] En ciertas realizaciones, las formulaciones adecuadas para la administración oral se presentan como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo.

[0095] En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen uno o más compuestos de la invención junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración pretendido. Cuando se usa para uso oral, por ejemplo, se pueden preparar tabletas, grageas, comprimidos, suspensiones acuosas o oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes, incluidos agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes para proporcionar una preparación apetecible. Son aceptables los comprimidos que contienen el ingrediente activo mezclado con un excipiente no tóxico farmacéuticamente aceptable que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o sodio, lactosa, lactosa monohidrato, croscarmelosa sódica, povidona, fosfato cálcico o sódico; agentes de granulación y desintegración, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como celulosa, celulosa microcristalina, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas que incluyen microencapsulación para retrasar la desintegración y adsorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

[0096] La cantidad de ingrediente activo que se combina con los ingredientes inactivos para producir una forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una forma de dosificación para administración oral a humanos contiene aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo formulado con una cantidad apropiada y conveniente de material portador (p. ej., ingrediente inactivo o material excipiente). En ciertas realizaciones, el material portador varía de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 95% de las composiciones totales (peso:peso). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen aproximadamente 1 a 800 mg, 1 a 600 mg, 1 a 400 mg, 1 a 200 mg, 1 a 100 mg o 1 a 50 mg del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento no contienen más de aproximadamente 400 mg del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento contienen aproximadamente 100 mg del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0097] Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo

en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellas adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

[0098] Se proporcionan adicionalmente las composiciones veterinarias que comprenden al menos un ingrediente activo como se definió anteriormente junto con un vehículo veterinario.

[0099] Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son de otro modo inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía oral, parenteral o por cualquier otra vía deseada.

[0100] La dosis efectiva de ingrediente activo depende al menos de la naturaleza de la afección a tratar, la toxicidad, si el compuesto se está utilizando profilácticamente (dosis más bajas), el método de entrega, y la formulación farmacéutica, y será determinada por el médico que utiliza estudios de escalada de dosis convencionales.

Vías de administración

[0101] Uno o más compuestos de la invención (en adelante referidos como los ingredientes activos), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden administrar por cualquier vía apropiada para la afección a tratar. Las rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y similares. Se apreciará que la ruta preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del receptor. Una ventaja de los compuestos de esta invención es que están biodisponibles por vía oral y pueden dosificarse por vía oral. Por consiguiente, en una realización, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento son formas de dosificación oral. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento son formas de dosificación sólidas orales.

[0102] Un experto en la técnica reconocerá que los sustituyentes y otros restos de los compuestos de la fórmula genérica en el presente documento deben ser seleccionados con el fin de proporcionar un compuesto que es suficientemente estable para proporcionar un compuesto farmacéuticamente útil que puede formularse en un establo aceptablemente composición farmacéutica. Se contempla que los compuestos que tienen tal estabilidad caen dentro del alcance de la presente invención. Un experto en la técnica debe entender que cualquier combinación de las definiciones y sustituyentes descritos anteriormente no debe dar como resultado una especie o compuesto inoperable.

Terapia de combinación

[0103] En otra realización más, la presente solicitud describe composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un agente adicional terapéutico (es decir, ingrediente activo), y un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales incluyen agentes antivirales adicionales.

[0104] El agente terapéutico adicional usado en combinación con los compuestos descritos en la presente memoria incluye, sin limitación, cualquier agente que tiene un efecto terapéutico cuando se usa en combinación con el compuesto de la presente invención. Dichas combinaciones se seleccionan en función de la afección a tratar, las reactividades cruzadas de los ingredientes y las propiedades de la combinación de la farmacopea. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente terapéutico usado en combinación con los compuestos de la invención incluye, sin limitación, uno o más de los siguientes: interferones, análogos de ribavirina, inhibidores de proteasa NS3, inhibidores NS5a, inhibidores NS5b, inhibidores de alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, inhibidores no nucleósidos del VHC, análogos de nucleósidos y otros fármacos para el tratamiento de la infección por VHC. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales incluyen, sin limitación, inhibidores de la proteasa NS3, inhibidores de NS5a y/o inhibidores de NS5b. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más de un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de NS5a y/o un inhibidor de NS5b. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más de un inhibidor de NS5a y/o un inhibidor de NS5b. En determinadas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de la invención y uno o más agentes antivirales adicionales, en los que el agente antivírico adicional no es un interferón, ribavirina o un análogo de ribavirina. En realizaciones adicionales, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de la invención y uno o más agentes antivirales adicionales, en donde el agente antivírico adicional no es ribavirina o un análogo de ribavirina.

[0105] En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se combinan con uno o más de otros ingredientes activos (p. ej., uno o más agentes antivirales adicionales) en una forma de dosificación unitaria para la administración simultánea o secuencial a un paciente. La terapia de combinación se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se administra en dos o más administraciones. En ciertas realizaciones, los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o entregados simultáneamente en una composición farmacéutica combinada; (2) administrados por alternancia o en

paralelo como composición farmacéutica separada; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administran en terapia de alternancia, los ingredientes activos se administran secuencialmente, por ejemplo, en tabletas, píldoras o cápsulas separadas, o mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosis eficaz de cada ingrediente activo de forma secuencial, es decir, en serie, mientras que en la

[0106] Los ejemplos de interferones incluyen, sin limitación, rIFN-alfa 2b pegilado (PEG-Intron), rIFN-alfa 2a pegilado (Pegasys), rIFN-alfa 2b (Intron A), rIFN-alfa 2a (Roferon-A), interferón alfa (MOR-22, OPC-18, Alfaferone, Alfanative, Multiferon, subalin), interferón alfacon-1 (Infergen), interferón alfa-n1 (Wellferon), interferón alfa-n3 (Alferon), interferón-beta (Avonex, DL -8234), interferón omega (omega DUROS, Biomed 510), albinterferón alfa-2b (Albuferon), IFN alfa XL, BLX-883 (Locteron), DA-3021, interferón alfa-2b glucosilado (AVI-005), PEG -Infergen, interferón lambda pegilado (IL-29 PEGilado) o belerofon, IFN alfa-2b XL, rIFN-alfa 2a, IFN de consenso alfa, infergen, rebif, IFN-beta pegilado, interferón alfa oral, ferón, reaferón, intermax alfa, r-IFN-beta e infergen + actinmune.

[0107] Los ejemplos de ribavirina análogos incluyen, sin limitación, ribavirina (Rebetol, Copegus), levovirina VX-497, y taribavirina (Viramidina).

[0108] Los inhibidores de NS5A ejemplares incluyen, sin limitación, ledipasvir (GS-5885), GS-5816, JNJ-47910382, daclatasvir (BMS-790052), ABT-267, MK-8742, EDP-239, IDX-719, PPI -668, GSK-2336805, ACH-3102, A-831, A-689, AZD-2836 (A-831), AZD-7295 (A-689) y BMS-790052.

[0109] Los inhibidores de NS5B ejemplares incluyen, sin limitación, el inhibidor de la polimerasa es sofosbuvir (GS-7977), tegobuvir (GS-9190), GS-9669, TMC647055, ABT-333, ABT-072, setrobuvir (ANA-598), filibuvir (PF-868554), VX-222, IDX-375, IDX-184, IDX-102, BI-207127, valopicitabina (NM-283), R1626, PSI-6130 (R1656), PSI-7851, BCX-4678, nesbuvir (HCV-796), BILB 1941, MK-0608, NM-107, R7128, VCH-759, GSK625433, XTL-2125, VCH-916, JTK-652, MK-3281, VBY-708, A848837, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, BMS-791325 y BILB-1941.

[0110] Los inhibidores de la proteasa NS3 ejemplares incluyen, sin limitación, GS-9451, GS-9256, simeprevir (TMC-435), ABT- 450, bocoprevir (SCH-503034), narlaprevir (SCH-900518), vaniprevir (MK-7009), MK-5172, danoprevir (ITMN-191), sovaprevir (ACH-1625), neceprevir (ACH-2684), Telaprevir (VX-950), VX-813, VX-500, faldaprevir (BI-201335), asunaprevir (BMS-650032), BMS-605339, VBY-376, PHX-1766, YH5531, BILN-2065 y BILN-2061.

[0111] Los ejemplos de alfa-glucosidasa 1 inhibidores incluyen, sin limitación, celgosivir (MX-3253), miglitol, y UT-231 B.

[0112] Los ejemplos de hepatoprotectores incluyen, sin limitación, IDN-6556, ME 3738, MitoQ, y LB-84451.

[0113] Los inhibidores no nucleósidos ejemplares del VHC incluyen, sin limitación, derivados de benzoimidazol, derivados de benzo-1,2,4- tiadiazina y derivados de fenilalanina.

[0114] Los análogos de nucleósidos ejemplares incluyen, sin limitación, ribavirina, viramidina, levovirina, un L-nucleósido o isatoribina y dicho interferón es α -interferón o interferón pegilado.

[0115] Otros fármacos ejemplares para el tratamiento de la infección por VHC incluyen, sin limitación, imiquimod, 852A, GS-9524, ANA-773, ANA-975, AZD-8848 (DSP-3025), PF-04878691 y SM-360320, ciclofilina inhibidores (p. ej., DEBIO-025, SCY- 635 o NIM811) o inhibidores de IRES del VHC (p. ej., MCI-067); emericasan (IDN-6556), ME-3738, GS-9450 (LB-84451), silibilina o MitoQ. BAS-100, SPI-452, PF-4194477, TMC-41629, GS-9350, GS-9585 y roxitromicina.

[0116] Adicionales ejemplos de otros fármacos para tratar la infección por VHC incluyen, sin limitación, ZADAXIN, nitazoxanida (alinea), BIVN-401 (ViroStat), DEBIO-025, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, bavituximab, oglufanide, PYN -17, KPE02003002, actilon (CPG-10101), KRN-7000, civacir, GI-5005, ANA-975 (isatoribina), XTL-6865, ANA 971, NOV- 205, tarvacina, EHC- 18 y NIM811.

[0117] Otros fármacos ejemplares más para tratar la infección por VHC incluyen, sin limitación, timosina alfa 1 (Zadaxin), nitazoxanida (Alinea, NTZ), BIVN-401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilon (CPG-10101), GS-9525, KRN-7000, civacir, GI-5005, XTL-6865, BIT225, PTX-111, ITX2865, TT-033i, ANA 971, NOV-205, tarvacina, EHC- 18, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, BMS-650032, Bavituximab, MDX-1106 (ONO-4538), Oglufanida, FK-788, VX-497 (merimepodib), DEBIO-025, ANA-975 (isatoribina), XTL-6865 o NIM811.

Procedimientos sintéticos generales

[0118] Los esquemas, procedimientos y ejemplos proporcionados en el presente documento describen la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento, así como los intermedios utilizados para preparar los compuestos. Debe entenderse que se pueden combinar los pasos individuales descritos en este documento. También debe entenderse que pueden combinarse lotes separados de un compuesto y luego llevarse a cabo en el siguiente paso

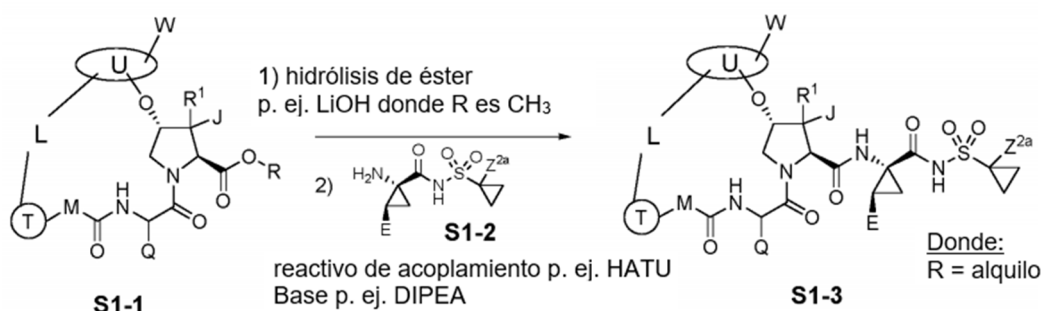
sintético.

[0119] Los siguientes esquemas describen métodos que son útiles para preparar compuestos descritos en este documento.

[0120] LF es un "fragmento enlazador" (es decir, un precursor de L) en el que un enlace carbono-carbono insaturado unido (p. ej., alqueno o alquino) en la porción de LF distal a T facilita, como ejemplo no limitante, una reacción catalizada por metal que da como resultado la conexión de L_F a U para formar un grupo L. Los ejemplos no limitantes de reacciones catalizadas por metales que dan como resultado tal conexión incluyen metátesis de cierre de anillo catalizada por Ru o una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por Pd (p. ej., acoplamientos de Negishi, Heck o Sonagashira).

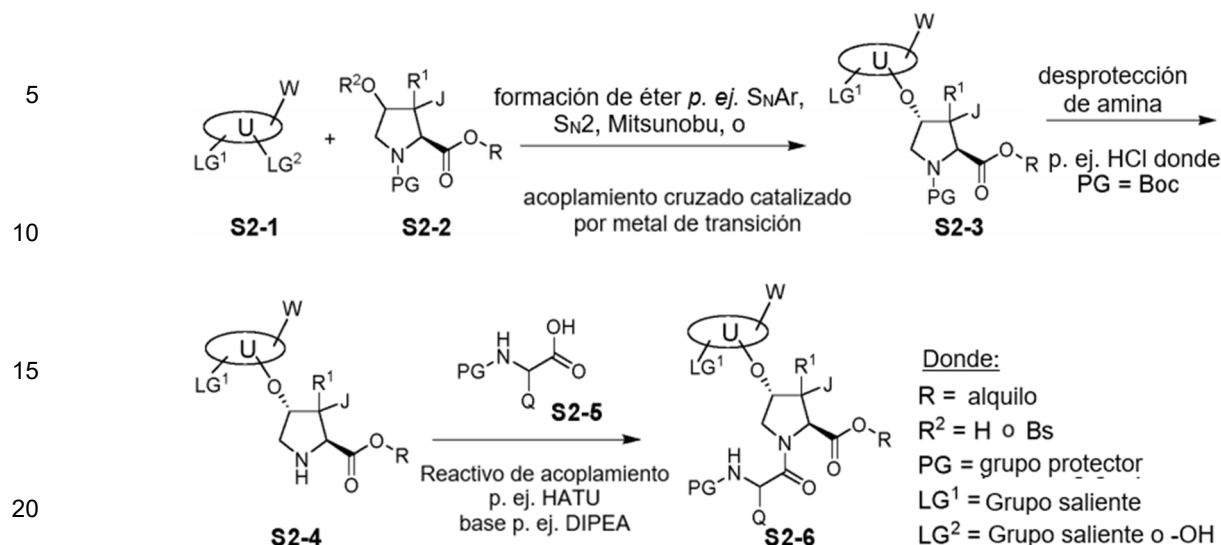
[0121] Espectros de resonancia magnética ¹H nuclear (RMN) en todos los casos eran consistentes con las estructuras propuestas. Los desplazamientos químicos característicos (δ) se dan en partes por millón campo abajo del tetrametilsilano usando abreviaturas convencionales para la designación de picos principales: p. ej. s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; m, multiplete; br, amplio. Se han utilizado las siguientes abreviaturas para disolventes comunes utilizados en experimentos de resonancia magnética nuclear: CDCl₃, deuterocloroformo; CD₃OD, perdeuterometanol; CD₃CN, perdeuteroacetonitrilo; d₆-DMSO, perdeuterodimetilsulfóxido. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando espectrómetros de masas Thermo Scientific o Agilent Technologies equipados con ionización por electropulverización (ESI). Las masas se informan como relaciones de masa a carga (m/z) de, por ejemplo, un ión del compuesto (representado por [M]⁺), un ión formado a partir del compuesto con otro ión, como un ión de hidrógeno (representado por [M+H]⁺), un ion sodio (representado por [M+Na]⁺), un ion formado a partir del compuesto al perder un ion, como el compuesto desprotonado (representado por [M-H]⁻), etc. Las mediciones de HPLC analítica se realizaron en HPLC Agilent Technologies Serie 1100 usando una columna Phenomenex Kinetex C18, 2,6 μm 100 Å, 4,6 x 100 mm con un programa de elución de disolvente B al 2% durante 0,55 min, gradiente a disolvente B al 98% durante 8 min, que se mantiene al 98% de disolvente B durante 0,40 min antes de volver al 2% de disolvente B durante 0,02 min y se mantiene al 2% de disolvente B durante 2,03 min a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (Disolvente A = H₂O filtrado con MiliQ + TFA al 0,1%, Disolvente B = MeCN + TFA al 0,1%). El término "cromatografía en capa fina (TLC)" se refiere a cromatografía en gel de sílice usando placas de gel de sílice 60 F₂₅₄. El factor de retención ("R_f") de un compuesto es la distancia recorrida por un compuesto dividida por la distancia recorrida por el frente del solvente en una placa de TLC. Términos como "elución temprana" y "elución tardía" se refieren al orden en el que un compuesto eluye o se recupera de un método de cromatografía basado en fase móvil de fase estacionaria sólida/disolvente líquido (p. ej., cromatografía en gel de sílice en fase normal o cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (HPLC)).

Esquema 1



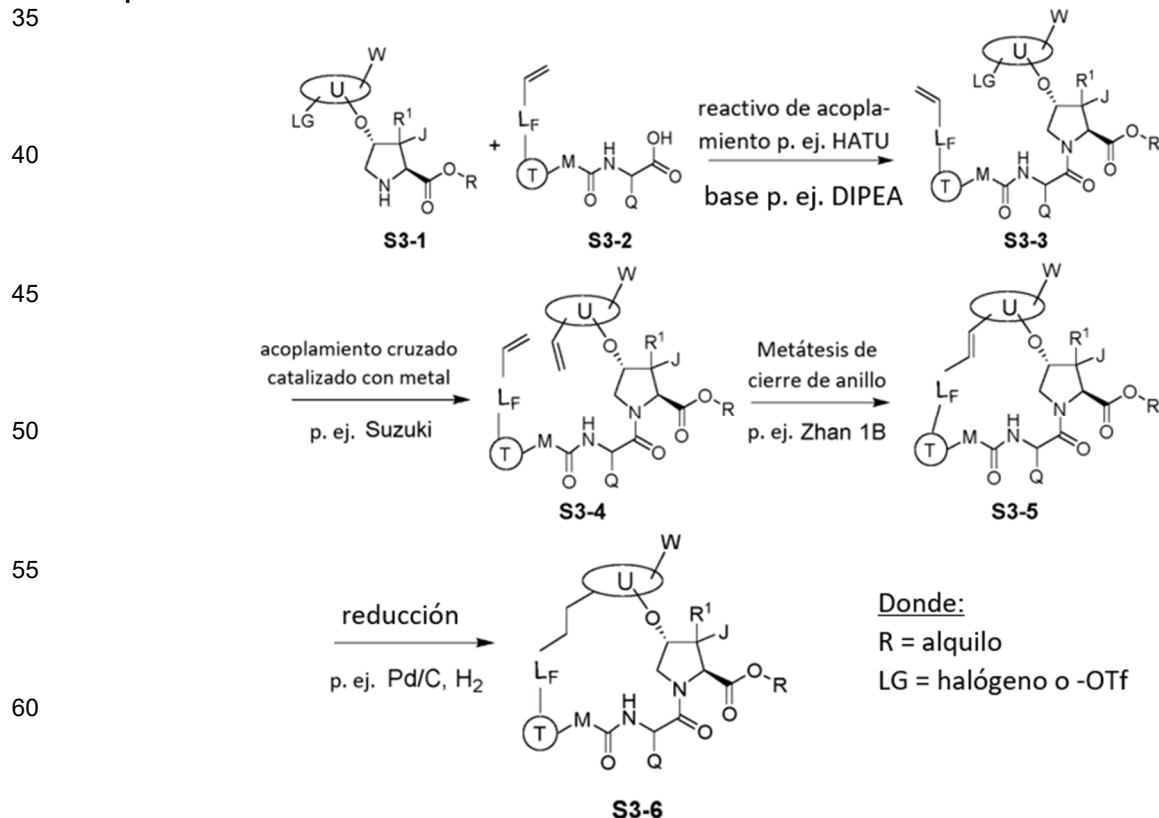
[0122] El esquema 1 demuestra una ruta general a S1-3, donde se definen J, R¹, R, M, L, T, U, W, Q, Z^{2a}. En el esquema 1, el éster intermedio **S1-1** se hidroliza con una base tal como hidróxido de litio cuando R es alquilo C₁-C₃ (p. ej., metilo), o con un ácido tal como ácido trifluoroacético cuando R es *tert*-butilo. El producto de la hidrólisis del éster se acopla luego a un intermedio **S1-2** a través de una reacción de acoplamiento (p. ej., usando un agente de acoplamiento de péptidos como HATU y una base como DIPEA) para generar compuestos de estructura general **S1-3**.

Esquema 2



[0123] El esquema 2 muestra una síntesis general de un intermedio **S2-6** donde se definen U, W, R¹, J y Q. En el esquema 2, una especie de prolina adecuadamente sustituida y protegida **S2-2** se somete a una reacción de eterificación como S_NAr (p. ej., tratamiento con CS_2CO_3 y **S2-1** donde R² es H y LG² es halógeno), S_N2 (p. ej., preconversión de **S2-2** a un bromilato (R² es Bs) seguido de tratamiento con **S2-1** donde LG² es -OH y base tal como DABCO), la reacción de Mitsunobu (p. ej., el tratamiento de la **S2-2** con DIAD y trifetilfosfina seguido por **S2-1** donde LG² es -OH) o reacción de acoplamiento cruzado catalizada por metal (LG² es halógeno, R² es H) para generar el intermedio **S2-3**. El intermedio **S2-3** se desprotege (p. ej., 4 N HCl en dioxano cuando PG es Boc) para producir el intermedio **S2-4**. La formación de enlaces amida mediante la activación del ácido carboxílico de **S2-5** usando agentes de acoplamiento de péptidos u otros métodos de activación de ácido carboxílico antes del tratamiento de **S2-4** proporciona el intermedio **S2-6**.

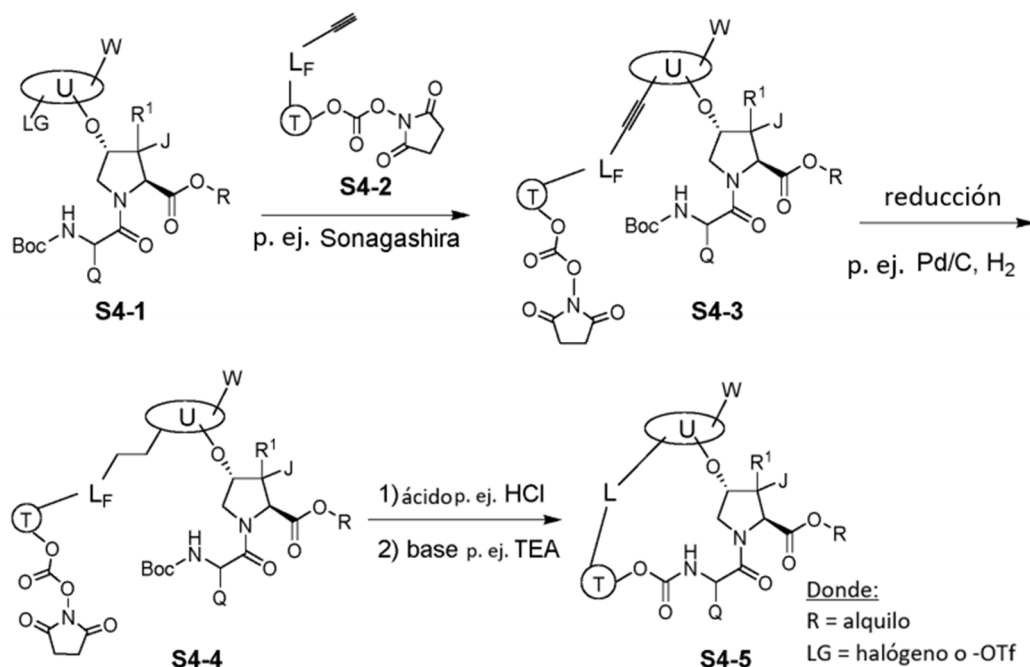
Esquema 3



[0124] El esquema 3 muestra una síntesis general del intermedio **S3-6** donde LF-CH₂-CH₂ es L y se definen U, W, R¹, J, Q, M, T y L. En el esquema 3, un intermedio **S3-1** se acopla mediante una reacción de formación de enlaces amida

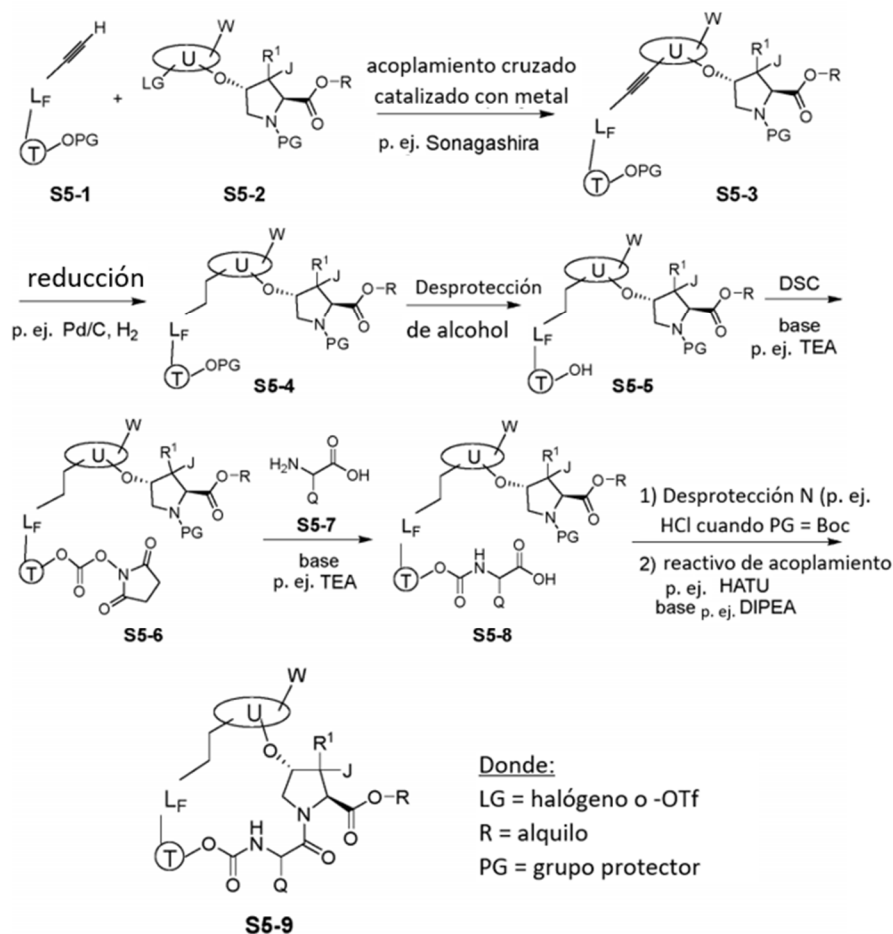
a un intermedio **S3-2** para proporcionar el intermedio **S3-3**. Acoplamiento cruzado catalizado por metal (p. ej. reacción de Suzuki usando viniltrifluoroborato de potasio, Et₃N, Pd(dppf)Cl₂) para dar **S3-4**, seguido de metátesis de cierre de anillo (p. ej. Zhan 1B) para dar **S3-5**, seguido por reducción del doble enlace (p. ej., H₂, 10% Pd/C) proporciona el intermedio **S3-6**.

Esquema 4



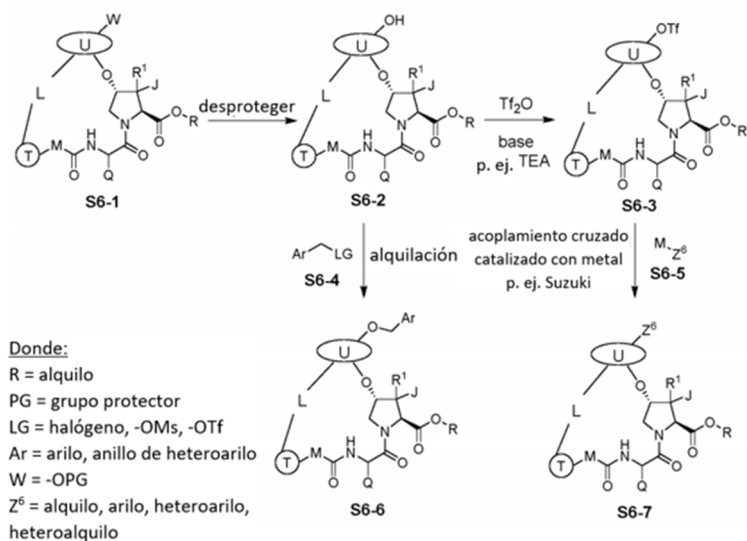
[0125] El esquema 4 muestra una síntesis general de un intermedio **S4-5** donde LF-CH₂-CH₂ es L y se definen U, W, R¹, J, Q, Q y L. En el esquema 4, el intermedio **S4-1** está protegido con un grupo protector como Boc. **S4-1** experimenta un acoplamiento cruzado catalizado por metales de transición (p. ej., acoplamiento de Sonogashira) a un **S4-2** intermedio para proporcionar el **S4-3** intermedio. El triple enlace del intermedio **S4-3** se reduce a un enlace sencillo mediante hidrogenación (p. ej., H₂, Pd/C catalítico al 10%) para dar el intermedio **S4-4**. La desprotección de la Boc-amina seguida de acoplamiento en condiciones básicas (p. ej., trietilamina) proporciona el intermedio **S4-5**.

Esquema 5



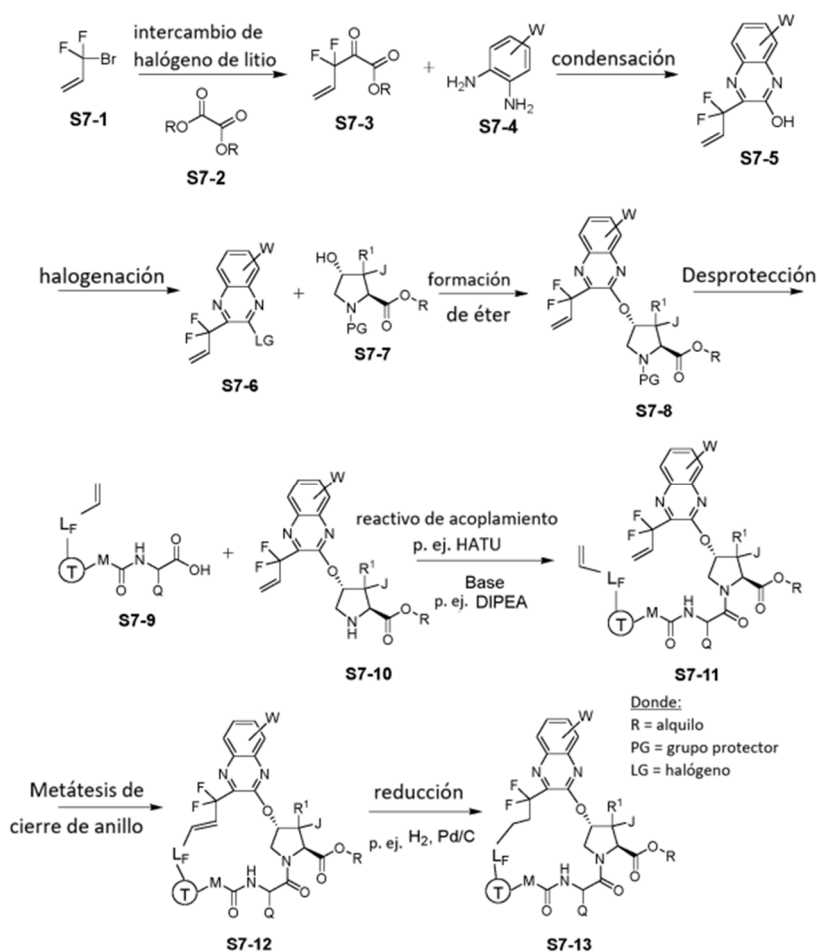
[0126] El esquema 5 muestra una síntesis general de un intermedio **S5-9** donde $\text{LF-CH}_2\text{-CH}_2$ es L y se definen U, W, R^1 , J, Q, T y L. En el esquema 5, el intermedio **S5-1** sufre un acoplamiento cruzado catalizado por metal (como la reacción de Sonogashira) con un intermedio **S5-2** para proporcionar el intermedio **S5-3**. El triple enlace del intermedio **S5-3** se reduce a un enlace sencillo bajo conducciones apropiadas tales como por hidrogenación (p. ej., usando H_2 sobre Pd/C catalítico al 10%) para dar el intermedio **S5-4**. La desprotección del alcohol para proporcionar **S5-5**, seguida de la activación (p. ej., DSC en condiciones básicas, por ejemplo, trietilamina) proporciona el intermedio **S5-6**. El acoplamiento de **S5-6** y **S5-7** en condiciones básicas proporciona **S5-8**. La desprotección del nitrógeno de prolina (p. ej., HCl en dioxano cuando PG = Boc) seguida de una macrolactamización (p. ej., un agente de acoplamiento como HATU en condiciones básicas) proporciona el intermedio **S5-9**.

Esquema 6



[0127] El Esquema 6 muestra una síntesis general de los compuestos intermedios **S6-6** y **S6-7** donde U, R¹, J, Q, M, T y L están definidos. En el esquema 6 intermedio **S6-1**, W es OPG, donde PG es un grupo protector. Primero se desprotege **S6-1** para dar el intermedio **S6-2**. La alquilación del intermedio **S6-2** con un electrófilo apropiado tal como **S6-4** proporciona el intermedio **S6-6**. La reacción de **S6-2** con anhídrido trifílico proporciona **S6-3**, que luego experimenta un acoplamiento cruzado catalizado por metal con un compañero de acoplamiento nucleofílico apropiado como **S6-5** (p. ej., reacción de Sonagashira o Suzuki) para proporcionar el intermedio **S6-7**.

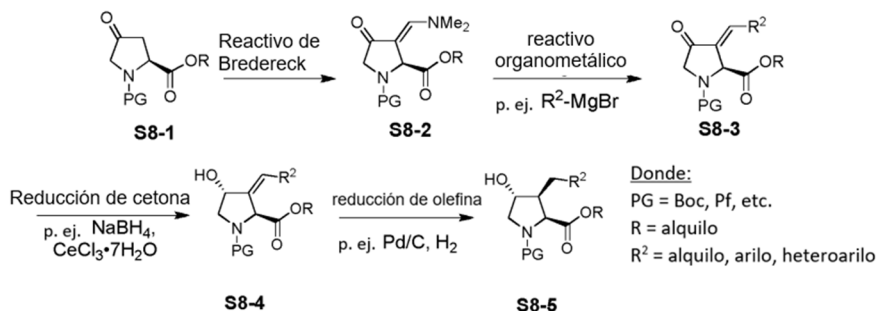
Esquema 7



[0128] El esquema 7 muestra una síntesis general del intermedio **S7-13** en el que LF-CH₂-CH₂-CF₂ es L y se definen

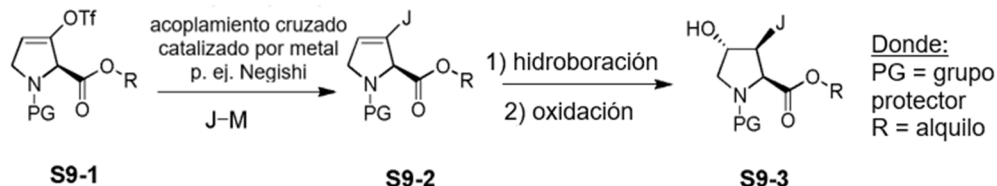
W, R¹, J, Q, M y T. En **S7-13**, L es alquilo C₁-C₃. En el esquema 7, el intermedio **S7-1** sufre primero intercambio de halógeno de litio y luego se trata con el intermedio **S7-2** para generar el intermedio **S7-3**, que luego se condensa con el intermedio **S7-4** para proporcionar el intermedio de quinoxalina **S7-5**. La halogenación del **S7-5** (p. ej. POCl₃) proporciona el intermedio **S7-6**. El intermedio **S7-6** se une mediante una formación de éter al intermedio **S7-7** a través de una reacción SNAr (p. ej., CS₂CO₃) para generar el intermedio **S7-8**. La desprotección de la N-PG del intermedio **S7-8** proporciona **S7-10**. Una reacción de acoplamiento de enlace amida de intermedio **S7-9** y el intermedio **S7-10** (p. ej. EDC y HOBT o HATU, NMM, DIPEA) proporciona el intermedio **S7-11**. La metátesis de cierre de anillo de **S7-11** genera intermedio **S7-12**. La reducción del doble enlace (p. ej., hidrogenación sobre paladio sobre carbono) proporciona el intermedio **S7-13**.

Esquema 8



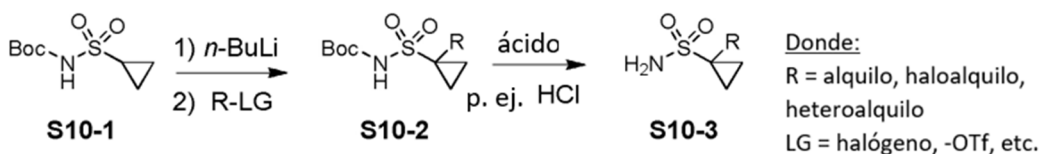
[0129] El esquema 8 muestra una síntesis general del intermedio **S8-5** en donde se hace reaccionar una 4-oxo prolina **S8-1** adecuadamente protegida con el reactivo de Bredereck para generar la enaminona **S8-2**. La adición de una especie organometálica proporciona enona **S8-3**, que sufre una reducción al intermedio hidroxilo **S8-4** de una manera estereoselectiva (p. ej., reducción de Luche o reducción de CBS). La posterior reducción de olefinas proporciona el intermedio **S8-5** de hidroxiprolina 3-sustituída.

Esquema 9



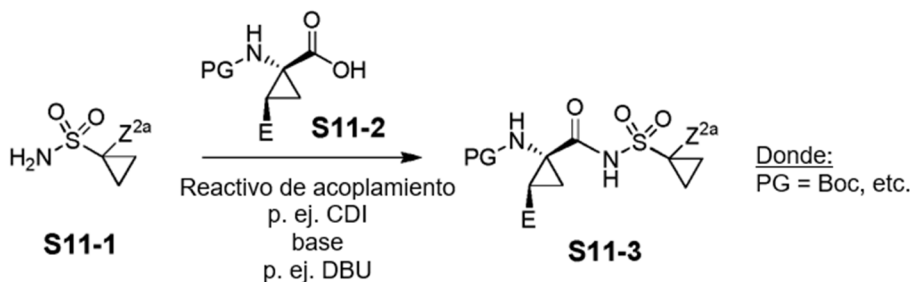
[0130] El esquema 9 muestra una síntesis general del intermedio **S9-3** en donde un triflato de vinilo **S9-1** (preparado, por ejemplo, mediante métodos en Kamenecka, TM, et al. Tetrahedron Letters, 2001, 8571) experimenta un acoplamiento cruzado catalizado por metales (p. ej. acoplamiento de Negishi) para generar intermedio **S9-2**. La hidrobioración y la posterior oxidación del intermedio **S9-2** proporciona el intermedio **S9-3**.

Esquema 10

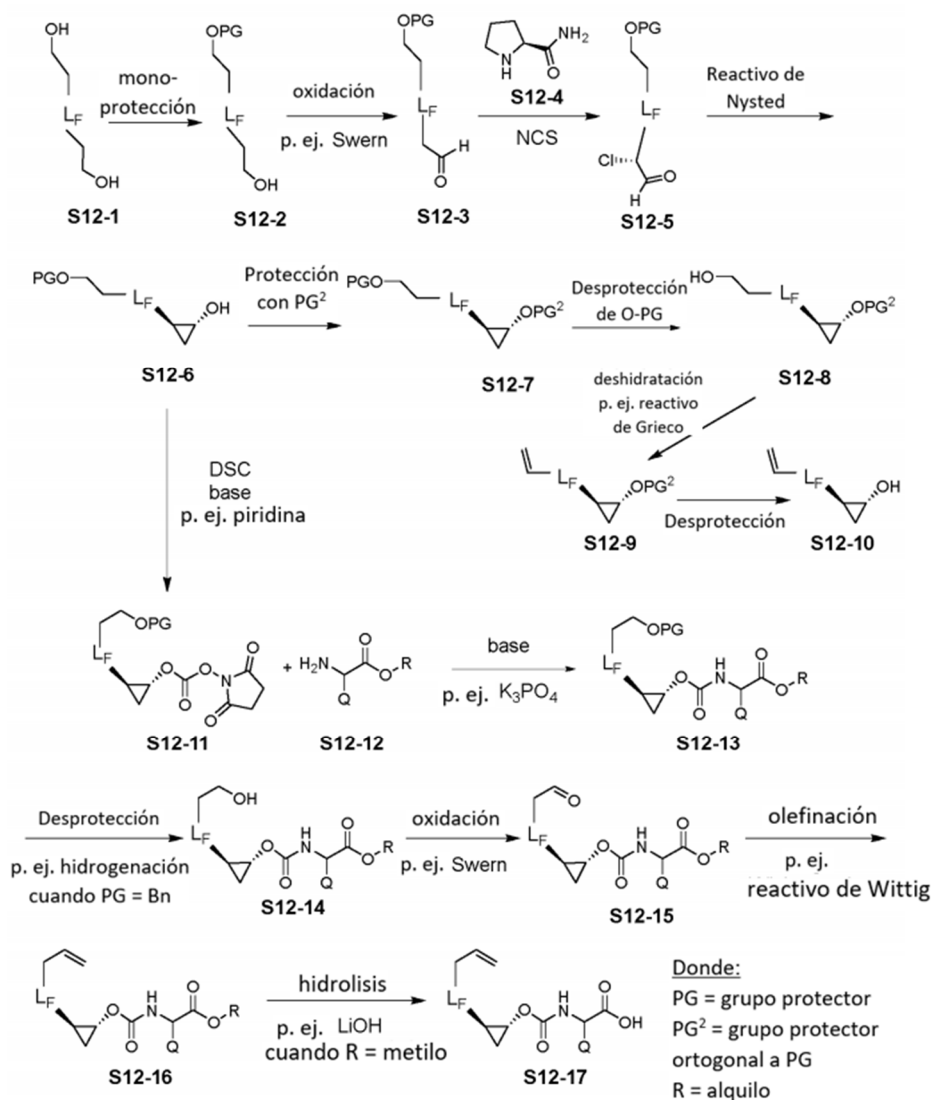


[0131] El esquema 10 muestra una síntesis general del intermedio **S10-3** de sulfonamida sustituida. Se desprotona ciclopropilsulfonilcarbamato de terc-butilo **S10-1** (p. ej., *n*-BuLi) y se hace reaccionar con un electrófilo (p. ej., haluro de alquilo) para dar el intermedio de sulfonamida sustituida protegida **S10-2**, que luego se desprotege (p. ej., 4 N HCl en dioxano) para proporcionar intermedio **S10-3**.

Esquema 11



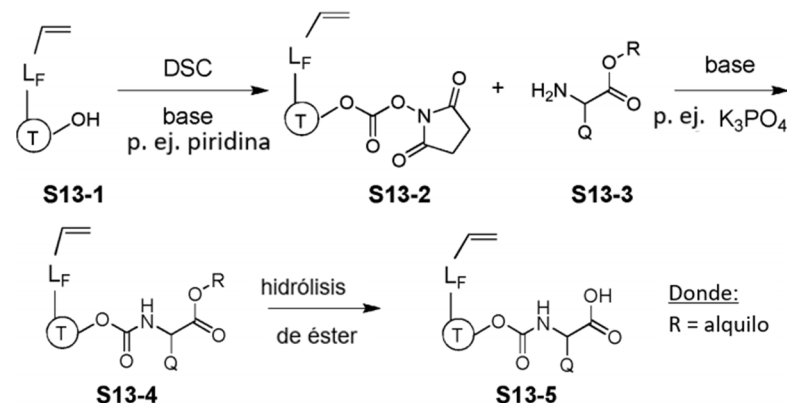
[0132] El esquema 11 muestra una síntesis general de un intermediario **S11-3** en el que se define E. En el Esquema 11, se acopla una sulfonamida **S11-1** a un aminoácido protegido **S11-2** usando un agente de acoplamiento como CDI y una base como DBU.



[0133] El esquema 12 muestra una síntesis general de los intermediarios **S12-10** y **S12-17**, donde LF es alqueno C₁-C₃. En el esquema 12, ambas síntesis comienzan con la monoprotección del intermediario **S12-1** para producir **S12-2**, seguida de oxidación (p. ej., oxidación de Swern) para proporcionar el intermediario **S12-3**. La cloración alfa enantioselectiva (p. ej., organocatalizador **S12-4** y NCS) proporciona cloroaldehído **S12-5**. La reacción de **S12-5** con un derivado de bis-zincio (p. ej., reactivo de Nysted) proporciona el intermediario ciclopropano **S12-6**. El intermediario **S12-6** está protegido ortogonalmente para proporcionar el intermediario **S12-7**. La desprotección de -OPG de **S12-7** proporciona el intermediario **S12-8**, que es posteriormente deshidratada (p. ej. el reactivo de Grieco) a intermediario **S12-9** y finalmente O-PG² se elimina para proporcionar el producto intermediario **S12-10**. El intermediario **S12-6** se activa alternativamente (p. ej., DSC y una base tal como piridina) para proporcionar el intermediario **S12-11** que se acopla al intermediario **S12-12** para proporcionar el carbamato intermediario **S12-13**. El intermediario **S12-13** se desprotege para dar

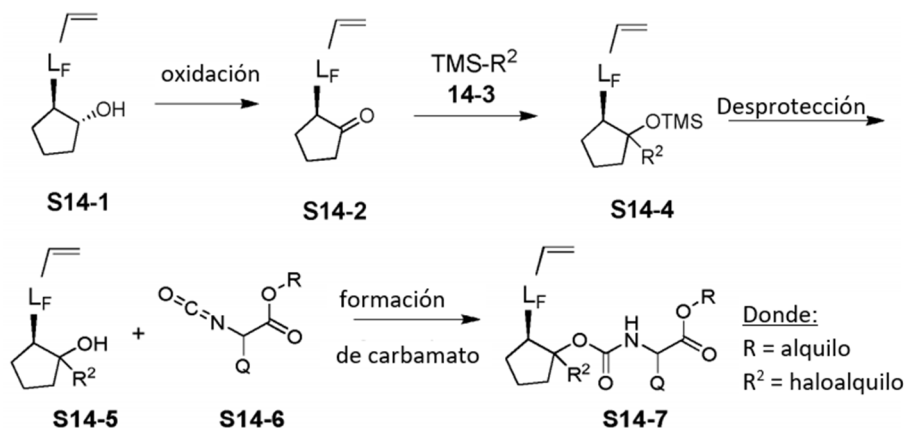
el intermedio **S12-14**, que luego se oxida (p. ej., oxidación de Swern) para proporcionar el intermedio de aldehído **S12-15**. La olefinación (p. ej., reacción de Wittig) del intermedio **S12-15** proporciona el intermedio **S12-16**. La hidrólisis del éster (p. ej., LiOH cuando R es metilo, TFA cuando R = *terc*-butilo) proporciona el intermedio **S12-17**.

Esquema 13



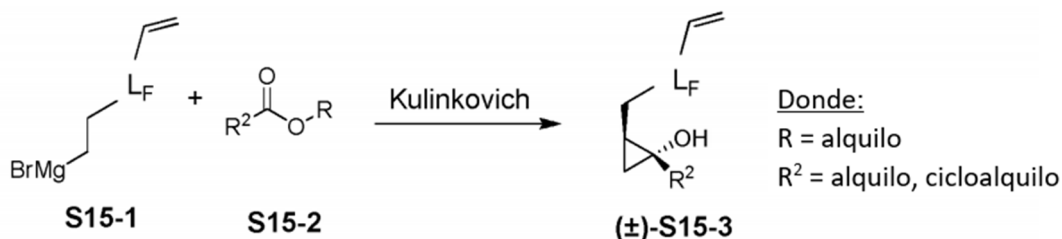
[0134] El esquema 13 muestra una síntesis general del intermedio **S13-5** donde Q y T están definidos y LF es alquileo C₁-C₃. La activación del intermedio **S13-1** (p. ej., DSC) seguida de la formación de carbamato entre el intermedio **S13-2** y el éster de aminoácido intermedio **S13-3** en condiciones básicas da el éster intermedio **S13-4**. La hidrólisis del éster (p. ej., LiOH cuando R = metilo o TFA cuando R = *terc*-butilo) proporciona el intermedio **S13-5**.

Esquema 14



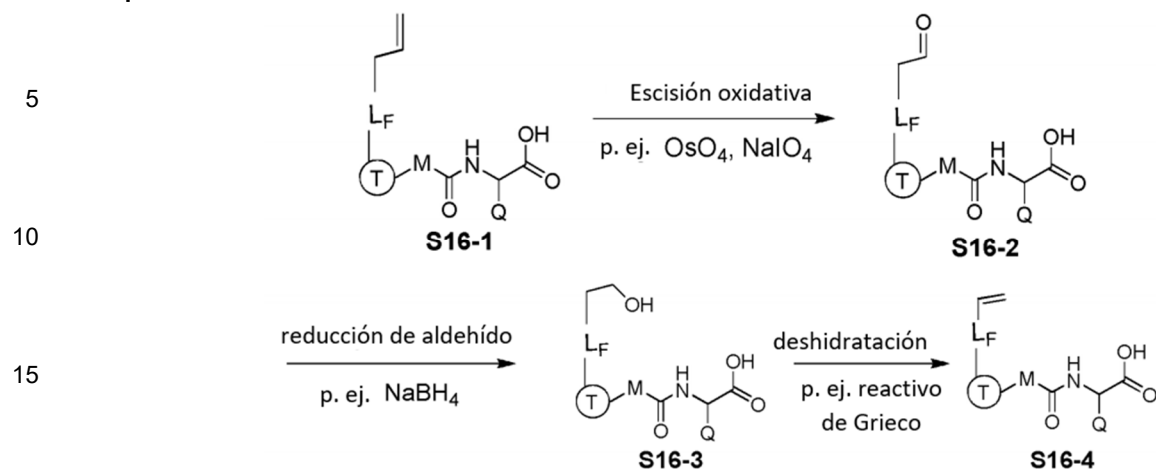
[0135] El esquema 14 muestra una síntesis general del intermedio **S14-7** donde Q se define y LF es C₁-C₃ alquileo. La oxidación del intermedio **S14-1** (p. ej., periodinano de Dess-Martin) produce la cetona **S14-2**. Tratamiento de **S14-2** con **S14-3** (p. ej. R² es -CF₃) en presencia de reactivo adecuado (tal como CsF) proporciona el intermedio **S14-4**. La desprotección de **S14-4** (p. ej. TBAF) proporciona **S14-5**, que se añade luego a un isocianato **S14-6** para dar el intermedio **S14-7**.

Esquema 15



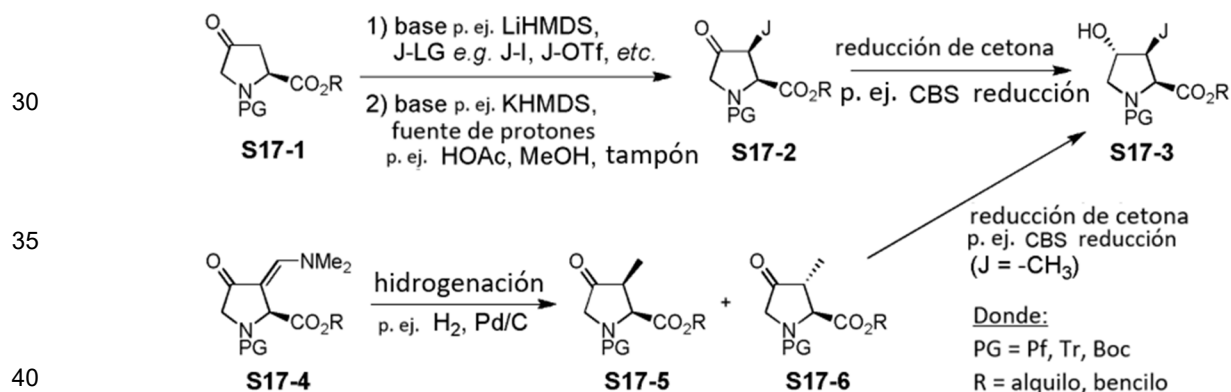
[0136] El esquema 15 muestra una síntesis general de un intermedio (±)-**S15-3**, generado a partir de la reacción de Kulinkovich de un reactivo de Grignard **S15-1** y un éster **S15-2**, de acuerdo con procedimientos estándar como descrito en Kulinkovich, OG y Kananovich, DG, Eur. J. Org. Chem. 2007, 2007, 2121.

Esquema 16



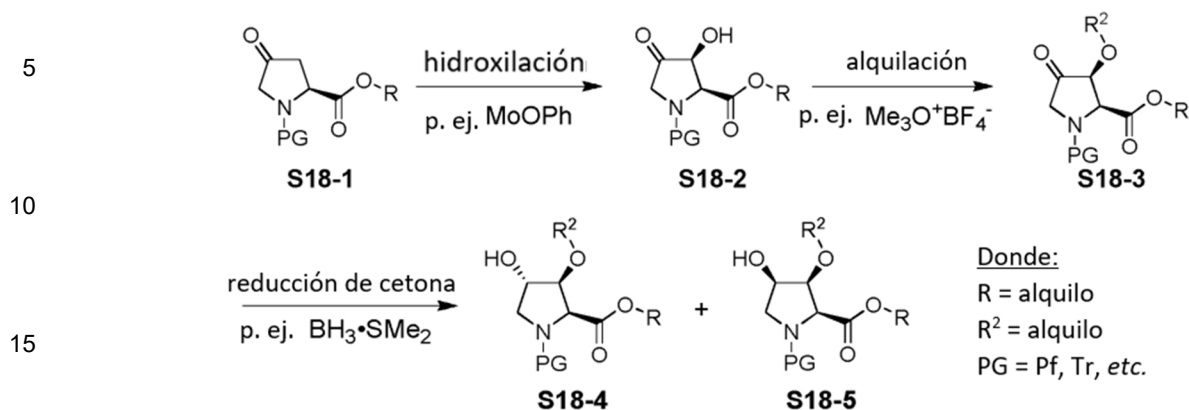
[0137] El esquema 16 muestra una síntesis general de un intermediario **S16-4** donde Q, M y T se definen y LF es C₁-C₃ alquileo. En el Esquema 16, olefina **S16-1** sufre escisión oxidativa (p. ej. OsO₄, NaIO₄) a aldehído **S16-2**, que se reduce a continuación al alcohol **S16-3** (p. ej. NaBH₄) y finalmente se deshidrata (p. ej., eliminación Grieco) para proporcionar intermediario **S16-4**.

Esquema 17



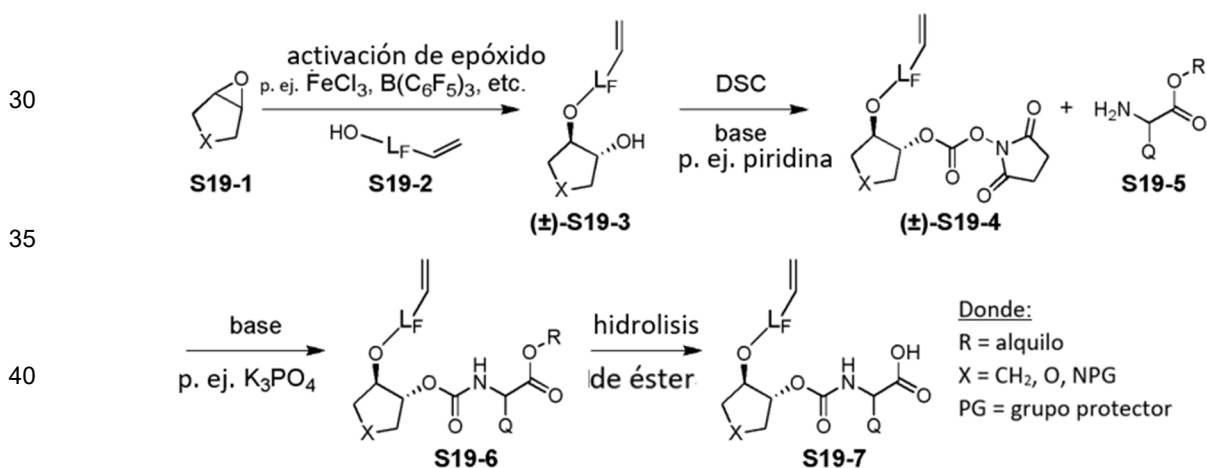
[0138] El esquema 17 muestra dos estrategias sintéticas generales para producir el intermediario **S17-3** donde se define J. En el Esquema 17, se desprotona y alquila una 4-oxoprolina **S17-1** adecuadamente protegida (p. ej., LiHMDS seguido de JLG). Una segunda desprotonación con base seguida de una nueva protonación a baja temperatura genera el intermediario **S17-2** enriquecido en estereo, basado en un protocolo descrito (Blanco, MJ. Et. Al. J. Org. Chem. 1999, 64, 8786). La reducción de la cetona de manera estereoselectiva (p. ej. reducción CBS) proporciona alcohol **S17-3**. Cuando J es metilo, el esquema 17 muestra una síntesis general alternativa en donde el intermediario **S17-4** se hidrogena para generar una mezcla de **S17-5** y **S17-6**. La reducción de cetona de **S17-5** de manera estereoselectiva (p. ej. reducción CBS) proporciona el intermediario **S17-3**, donde J es metilo.

Esquema 18



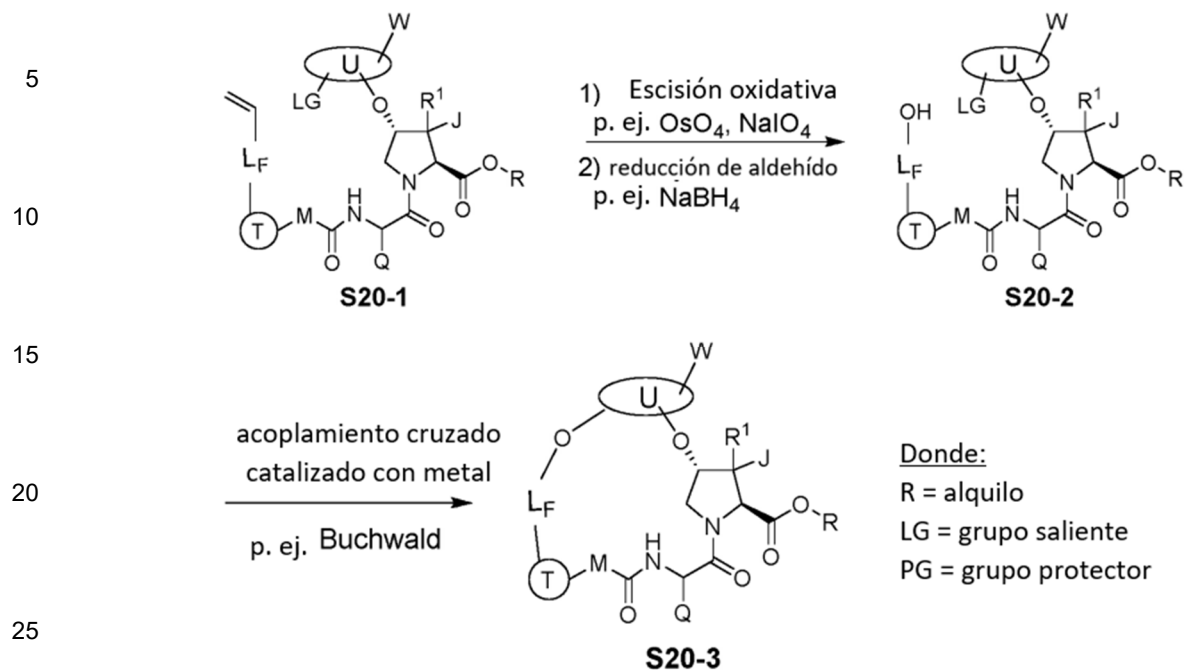
[0139] El esquema 18 muestra una síntesis general de los intermedios **S18-4** y **S18-5**, en donde una 4-oxo prolina **S18-1** protegida adecuadamente se hidroxila de manera estereoselectiva (p. ej., MoOPh) para proporcionar el intermedio **S18-2**, que posteriormente se reaccionó con un agente alquilante (p. ej., tetrafluoroborato de trimetiloxonio) para producir el intermedio **S18-3**. La reducción de la cetona (p. ej., complejo $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$) proporciona los intermedios **S18-4** y **S18-5**.

Esquema 19



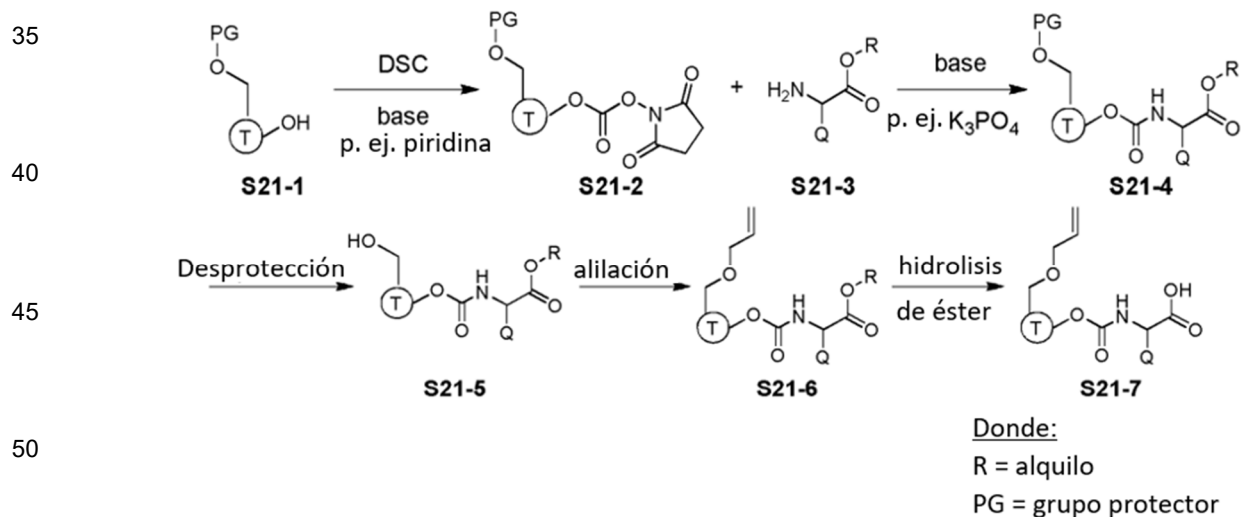
[0140] El esquema 19 muestra una síntesis general de un intermedio **S19-7** en el que Q se define y LF es alquileo C₁-C₃. En el esquema 19, un epóxido intermedio **S19-1** se convierte en el (±)-*trans*-intermedio **S19-3**. La activación del alcohol intermedio (±)-**S19-3** (p. ej. DSC) produce carbonato de (±)-**S19-4**, que se trata con intermedio **S19-5** para dar carbamato intermedio **S19-6**. El intermedio **S19-6** luego sufre hidrólisis de éster (p. ej., LiOH cuando R = metilo o TFA cuando R = *terc*-butilo) para proporcionar el intermedio **S19-7**.

Esquema 20



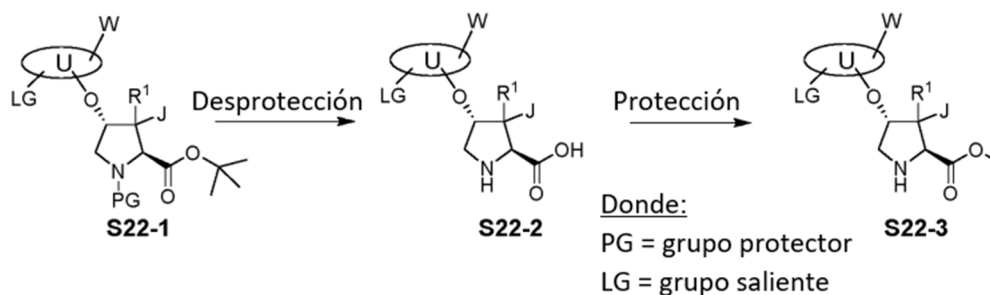
[0141] El esquema 20 muestra una síntesis general de un intermedio **S20-3** donde $\text{L}_\text{F}-\text{O}$ es F, y se definen U, W, R^1 , J, Q, M, T y L. En el esquema 20, el intermedio **S20-1** primero sufre escisión oxidativa de una olefina (p. ej. OsO_4 , NaIO_4) y posterior reducción del aldehído resultante (p. ej. NaBH_4) para proporcionar el intermedio **S20-2**. El acoplamiento cruzado catalizado por metal de transición proporciona el intermedio **S20-3**.

Esquema 21



[0142] El esquema 21 muestra una síntesis general de un intermedio **S21-7** donde se definen Q y T. En el esquema 21, la activación del diol mono-protegido **S21-1** (p. ej., DSC) seguida de acoplamiento con el intermedio aminoéster **S21-3** proporciona el intermedio carbamato **S21-4**. A continuación, se desprotege el intermedio **S21-4** para desenmascarar la funcionalidad de alcohol (intermedio **S21-5**) que luego se alila para proporcionar el intermedio **S21-6**. El intermedio **S21-6** luego sufre hidrólisis de éster (p. ej., LiOH cuando R = metilo o TFA cuando R = terc-butilo) para proporcionar el intermedio **S21-7**.

Esquema 22



[0143] El esquema 22 muestra una síntesis general de un intermediario **S22-3** donde se definen U, W, R¹, J y Q. En el esquema 22, el intermediario **S22-1** se desprotege globalmente para proporcionar el aminoácido intermediario **S22-2**. La funcionalidad de ácido del producto intermediario **S22-2** se convierte después en un éster lábil en medio básico carboxílico (p. ej. éster metílico), intermediario **S22-3**.

Preparación de intermedios seleccionados

Preparación del intermediario **A9**.

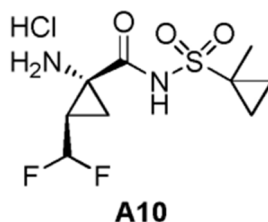
[0144]



[0145] Paso 1-2. Preparación del intermediario **A9**: El intermediario **A9** se preparó de manera similar al clorhidrato de (1R,2S)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonilo)-2-vinilciclopropano-carboxamida del Ejemplo 2.12 de WO '066 (pág. 75-76) sustituyendo **A9-1** (preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, Pasos 1L-10 de la Publicación de Patente Internacional N° WO 2009/134987, p. 75-77) para (1R,2S)-1-(terc-butoxicarbonilamino)-2-ácido vinilciclopropanocarboxílico.

Preparación del intermediario **A10**.

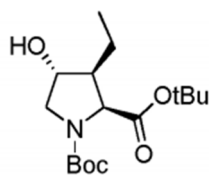
[0146]



[0147] Intermediario **A10** se preparó de forma similar al Intermediario **A9**, sustituyendo 1-metilciclopropano-1-sulfonamida (preparada de acuerdo con el Ejemplo 1.2 de WO '066, pág. 47) para ciclopropanosulfonamida.

Preparación del intermediario **B4**.

[0148]

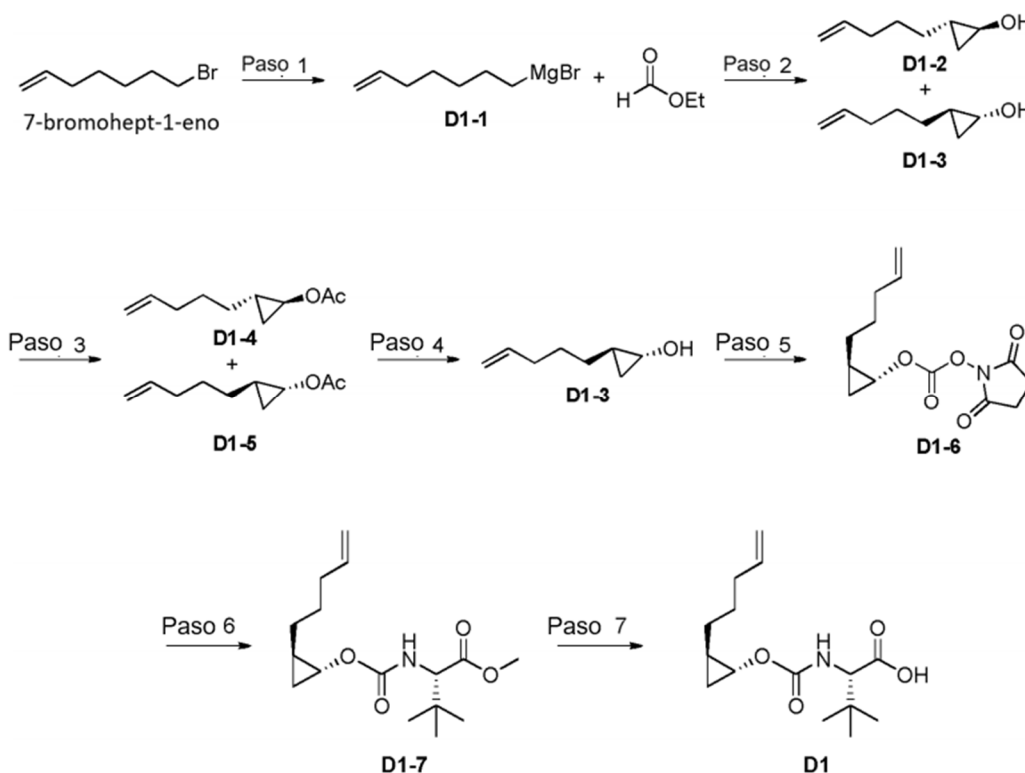


(2S,3S,4R)-di-*tert*-butilo 3-etilo-4-hidroxipirrolidina-1,2-dicarboxilato
B4

[0149] Intermedio **B4** ((2S,3S,4R)-di-*tert*-butilo 3-etilo-4-hidroxipirrolidina-1,2-dicarboxilato) se preparó de acuerdo con Camplo, M., et al. Tetrahedron 2005, 61, 3725.

Preparación del intermedio **D1**.

[0150]



[0151] Los pasos 1 y 2. Preparación de la mezcla de *trans*-ciclopropanol **D1-2** y **D1-3**: THF (1000 ml) se introdujo en un matraz de tres bocas de fondo redondo que contiene Mg (32,2 g, 1,34 mol). Se introdujo una solución de 7-bromohept-1-eno (216 g, 1,22 mol) en THF (600 ml) en un embudo de adición. Se añadieron a la reacción un cristal de yodo y 20 ml de solución de 7-bromohept-1-eno. La solución se calentó a reflujo y se añadió gota a gota el resto de la solución de 7-bromohept-1-eno. Una vez completada la adición, la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h más y luego se dejó enfriar a ta para producir una solución del reactivo de Grignard **D1-1**, que luego se añadió gota a gota a una solución de formiato de etilo (30 g, 0,41 mol) y Ti (O *i*-Pr)₄ (115,2 g, 0,41 mol) en THF (1200 ml) a ta. Después de agitar durante la noche, la mezcla se vertió en 1600 ml de H₂SO₄ acuoso al 10% y se extrajo con MTBE (1500 ml tres veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron *al vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para dar 31,0 g de una mezcla de alcoholes *trans*-ciclopropilo **D1-2** y **D1-3** como un aceite amarillo. ¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃): δ 5,77-5,70 (m, 1H), 4,96-4,86 (m, 2H), 3,15-3,12 (m, 1H), 2,03-1,98 (m, 2H), 1,75 (br s, 1H), 1,45-1,37 (m, 2H), 1,20-1,15 (m, 1H), 1,06-1,01 (m, 1H), 0,89-0,82 (m, 1H), 0,63-0,59 (m, 1H), 0,24 (q, *J* = 6,0 Hz, 1H).

[0152] Paso 3. Preparación de mezcla de acetato de ciclopropilo **D1-4** y **D1-5**: A un matraz de fondo redondo de 1000 ml se añadió mezcla de alcohol *trans*-ciclopropilo **D1-2** y **D1-3** (60,3 g, 0,48 mol), 700 ml de DCM y TEA (62,9 g, 0,62 mol) antes de enfriar la solución en un baño de acetona/hielo a una temperatura interna de <5°C. Se añadió gota a gota cloruro de acetilo (41,3 g, 0,53 mol) a la solución durante un período de 30 minutos mientras se mantenía una temperatura interna <10°C. La suspensión resultante se calentó luego a ta y se agitó durante 2 h. La mezcla de

reacción se diluyó con 350 mL de agua. La mezcla bifásica se transfirió a un embudo de decantación y se eliminó la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con 480 ml de HCl acuoso 2 N y luego con 500 ml de solución sat. NaHCO₃ acuosa antes de secar sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó *al vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para producir una mezcla **D1-4** y **D1-5** (56,3 g) en forma de un aceite amarillo. Información de TLC (PE/EtOAc = 5/1) R_f (material de partida) = 0,4; R_f (producto) = 0,8.

[0153] Paso 4. Preparación de **D1-3**: A un matraz de fondo redondo de 1000 mL se añadió una solución de mezcla **D1-4** y **D1-5** (39 g, 0,23 mol) en 680 ml de MTBE saturado con un tampón fosfato acuoso 0,1 M pH 7. El matraz se colocó en un baño de hielo para mantener una temperatura interna de aproximadamente 10°C durante toda la reacción de hidrólisis que se inició mediante la adición de 3,0 g de Novozyme 435. La reacción se envejeció a 10°C durante aproximadamente 6 h hasta que se alcanzó la conversión de alrededor del 40%. La mezcla de reacción se filtró y la enzima sólida inmovilizada se lavó tres veces con 200 ml de MTBE. La solución de MTBE resultante se concentró *al vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para producir **D1-3** (11,3 g) como un aceite amarillo. ¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃) δ 5,80-5,75 (m, 1H), 5,02-4,91 (m, 2H), 3,20-3,17 (m, 1H), 2,09-2,03 (m, 3H), 1,50-1,43 (m, 2H), 1,26-1,22 (m, 1H), 1,17-1,08 (m, 1H), 1,07-0,89 (m, 1H), 0,70-0,65 (m, 1H), 0,32-0,27 (m, 1H).

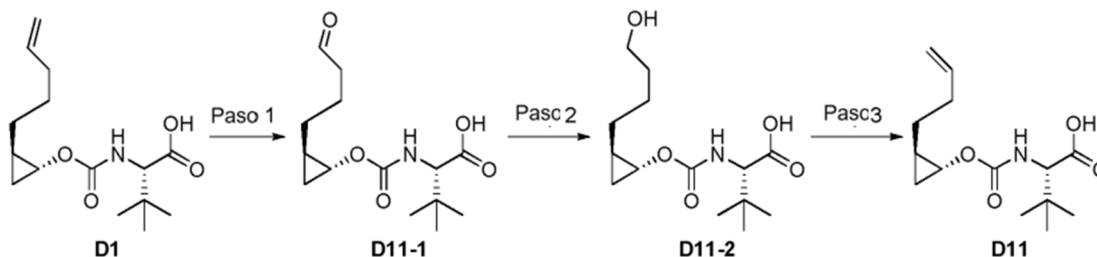
[0154] Paso 5. Preparación de **D1-6**: Ciclopropanol **D1-3** (17,7 g, 0,140 mol) se disolvió en 300 ml de MeCN a 0°C. A la solución se le añadió DSC (72,0 g, 0,280 mol) y TEA (42,42 g, 0,420 mol). La mezcla de reacción se calentó a 40°C y se agitó durante la noche y luego se concentró *al vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para producir **D1-6** (25,8 g) en forma de un sólido amarillo. ¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃) δ 5,84-5,77 (m, 1H), 5,05-4,96 (m, 2H), 4,09-4,03 (d, J = 24 Hz, 1H), 2,86 (s, 4H), 2,12-2,06 (m, 2H), 1,58-1,51 (m, 2H), 1,33-1,27 (m, 3H), 1,09 (m, 1H), 0,68-0,62 (m, 1H).

[0155] Paso 6. Preparación de **D1-7**: A una solución de **D1-6** (10 g, 0,0374 mol) en THF (374 ml) se añadió L-terc-leucina metilo éster clorhidrato (10,2 g, 0,056 mol) y TEA (11,3 g, 0,112 mol). La solución se agitó durante la noche a 40°C. La mezcla se concentró *al vacío*. El residuo se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró *al vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar **D1-7** (10,2 g) como un aceite amarillo. LCMS-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₂₈NO₄: 298,2; encontrado: 298,0.

[0156] Paso 7. Preparación del Compuesto Intermedio **D1**: Una solución A de **D1-7** (20 g, 0,067 mol) en 2:1 mezcla de MeOH/H₂O (447 ml/223 ml) se trató con LiOH·H₂O (11,3 g, 0,269 mol) y luego se calentó a 60°C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió, se concentró hasta la mitad del volumen y se extrajo con MTBE. Luego, la solución acuosa se acidificó con HCl acuoso 1 N (400 ml) y se extrajo con EtOAc (400 ml x 3), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para producir el Intermedio **D1** (18 g). ¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃) δ 10,5-9,4 (br, 1H), 5,82-5,71 (m, 1H), 5,20-5,17 (m, 1H), 4,99-4,91 (m, 2H), 4,19-4,16 (m, 1H), 3,86-3,68 (m, 1H), 2,09-2,03 (m, 2H), 1,53-1,32 (m, 2H), 1,30-1,20 (m, 2H), 1,18-1,13 (m, 1H), 1,11-0,99 (s, 9H), 0,80-0,75 (m, 1H), 0,49-0,47 (m, 1H).

Preparación del intermedio **D11**.

[0157]



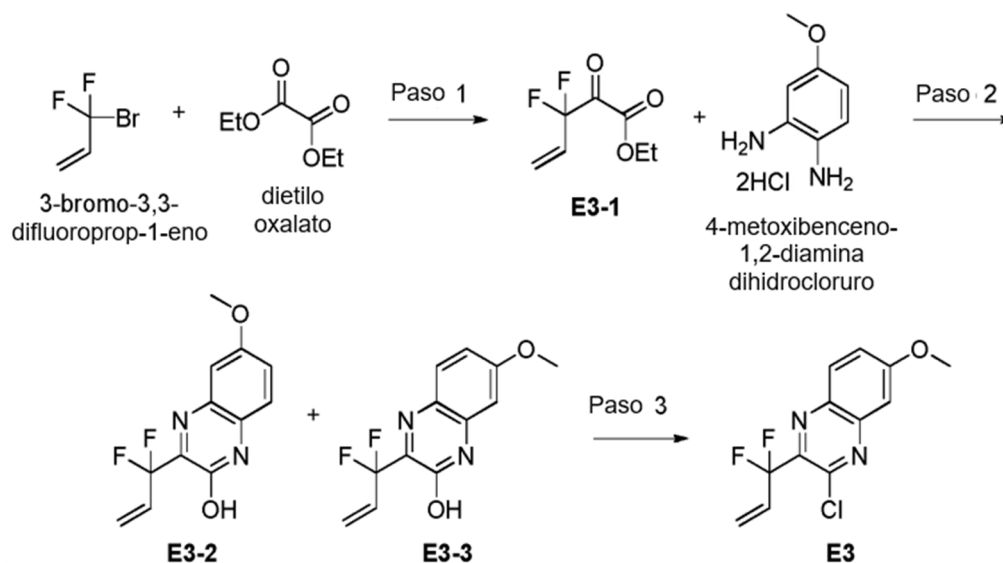
[0158] Paso 1. Preparación de **D11-1**: A una mezcla de **D1** (1,0 g, 3,53 mmol), peryodato de sodio (2,26 g, 10,59 mmol) en 24 ml de THF y 12 ml de agua se añadió Os EnCat™ 40 (carga de 0,25 mmol/g, 282 mg, 0,071 mmol, Sigma-Aldrich). La mezcla se agitó durante 3 días. Se añadió agua (50 ml) y se filtró la mezcla. La torta de filtrado se lavó con agua (volumen total 400 ml) y acetato de etilo (volumen total 600 ml). Se separaron las capas de filtrado. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar **D11-1** (1,56 g) que se usó sin purificación adicional. LCMS-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₂₄NO₅: 286,2 encontrado: 286,1.

[0159] Paso 2. Preparación de **D11-2**: A una solución de **D11-1** (3,05 g, 10,7 mmol) en MeOH (50 ml) a 0°C se añadió borohidruro de sodio en porciones (809 mg, 21,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 6 h. La mezcla se diluyó con 50 ml de acetato de etilo y 50 ml de salmuera y las capas se separaron. La fase orgánica se extrajo con dos porciones de 25 ml de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La mezcla de producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 10% a 100%) para dar **D11-2** (380 mg). LCMS-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₂₆NO₅: 288,2; encontrado: 288,1.

[0160] Paso 3. Preparación del producto intermedio **D11**: A una solución de **D11-2** (283 mg, 0,98 mmol) en THF (2,8 ml) a 0°C se añadió 1-nitro-2-selenocianatobenceno (336 mg, 1,47 mmol) y tributilfosfina (363 ml, 1,47 mmol). Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó durante 25 minutos a ta. La reacción se enfrió de nuevo a 0°C y se trató con una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (0,665 ml, 5,85 mmol) y se agitó durante 1 h a ta y luego se calentó a 60°C durante 1 h. La reacción se diluyó con EtOAc y el producto deseado se extrajo en bicarbonato de sodio acuoso. El extracto de bicarbonato se acidificó con 2 N HCl y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar el Intermedio **D11** (136 mg). LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₂₄NO₄: 270,2; encontrado: 270,1.

Preparación del intermedio **E3**.

[0161]



[0162] Paso 1. Preparación de **E3-1**: A una solución de 3-bromo-3,3-difluoroprop-1-eno (25,0 g, 159 mmol) y dietilo oxalato (21,6 ml, 159 mmol) se añadió gota a gota THF (380 ml), éter dietílico (90 ml) y *n*-pentano (90 ml) a -100°C, *n*-butillitio (2,5 M en hexano, 67 ml, 167,6 mmol) durante 30 min. La mezcla de reacción se agitó a -95°C durante 1 h y -78°C durante 2 h, y se inactivó con solución acuosa. NH₄Cl (11 g en 150 mL de agua). La mezcla se extrajo con éter (tres veces). Las capas orgánicas se lavaron con HCl acuoso 1 N, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron para dar el residuo bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 0% a 40%) para dar **E3-1** (7,0 g). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5,98-6,18 (m, 1 H), 5,78 (dd, *J* = 0,9 Hz, 13 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 0,9 Hz, 11 Hz, 1 H), 4,38 (q, *J* = 6,9 Hz, 2 H), 1,37 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H).

[0163] Paso 2. Preparación de **E3-2** y **E3-3**: A una solución de **E3-1** (14,0 g, 78,6 mmol) y 4-metoxibenceno-1,2-dihidrocloruro de diamina (15,08 g, 71,4 mmol) en EtOH (360 ml) a ta se añadió trietilamina (19,9 ml, 142,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante la noche. La mezcla se concentró. La suspensión en diclorometano (30 ml) y el filtrado dio alguna separación de regioisómeros con **E3-2** como especie precipitante. (Rendimiento total de 16,5 g por filtración y posterior cromatografía). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 11,940 (br s, 1 H), 7,850 (d, *J* = 9 Hz, 1 H), 6,985 (dd, *J* = 3 Hz, 9 Hz, 1 H), 6,754 (d, *J* = 2 Hz, 1 H), 6,625-6,498 (m, 1 H), 5,907 (dt, *J* = 17, 2 Hz, 1 H), 5,601 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 3,938 (s, 3 H). La mezcla se suspendió, se filtró y se concentró una vez más, luego se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 5% a 34%) para dar **E3-3** (2,07 g) como primer componente eluyente. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 12,05 (br s, 1 H), 7,850 (d, *J* = 9 Hz, 1 H), 6,986 (dd, *J* = 3 Hz, 9 Hz, 1 H), 6,761 (d, *J* = 3 Hz, 1 H), 6,597-6,526 (m, 1 H), 5,91 (dt, *J* = 17, 2 Hz, 1 H), 5,601 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 3,939 (s, 3 H).

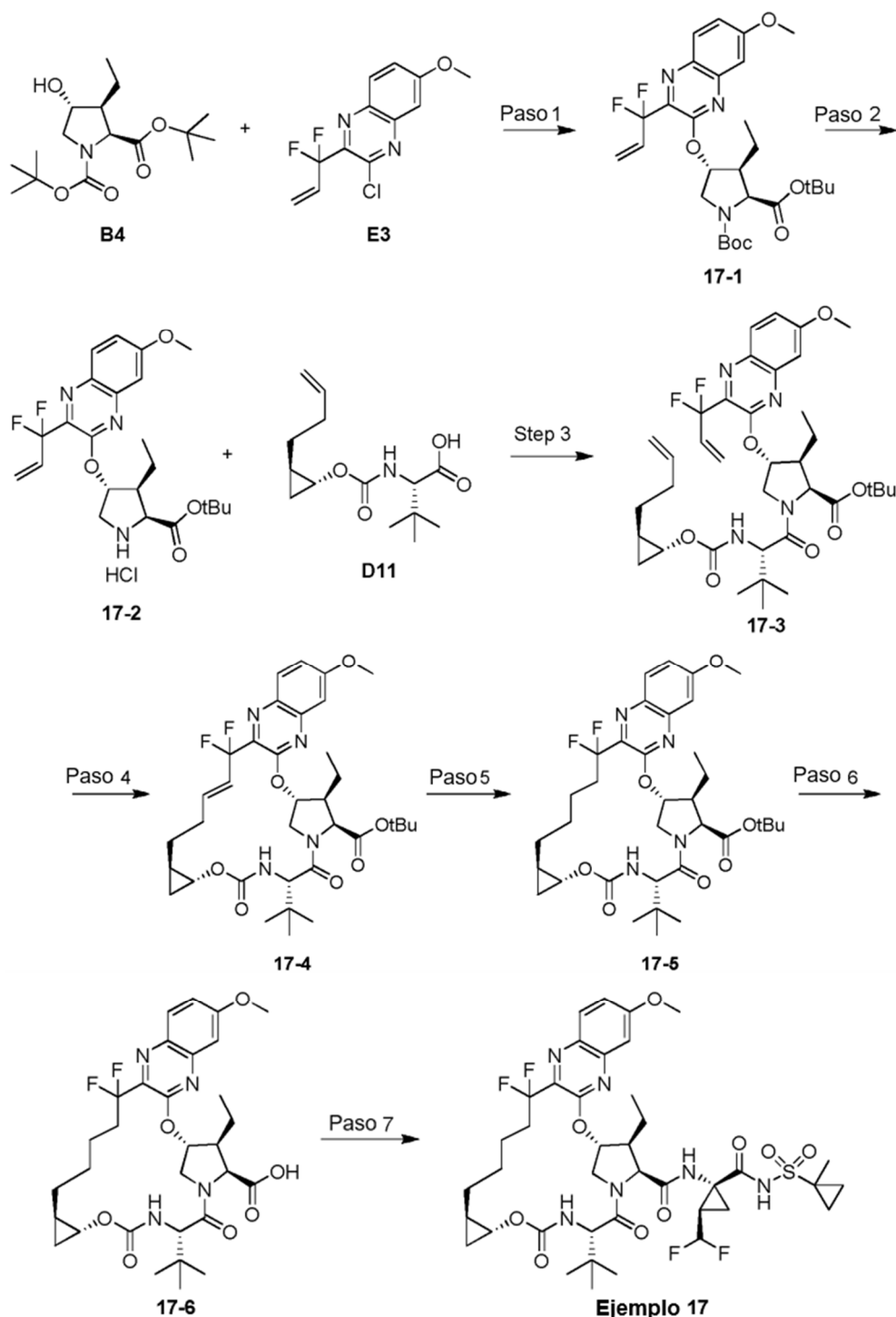
[0164] Paso 3 Preparación del Intermedio **E3**: la solución A de **E3-3** (2,07 g, 8,2 mmol en 1 ml de DMF se trató con POCl₃ (0,8 ml) y se calentó a 65°C durante 2,5 h se diluyó la reacción. con EtOAc y se inactivó vertiéndola en agua helada. La fase orgánica se lavó posteriormente con bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar 2,1 g de Intermedio **E3**. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,028 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 7,46 (dd, *J* = 3 Hz, 9 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 6,549-6,478 (m, 1H), 5,86 (dt, *J* = 17, 2 Hz, 1 H), 5,67 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 3,981 (s, 3 H).

Preparación de los ejemplos

Ejemplo 17. Preparación de (1aR, 5S, 8S, 9S, 10R, 22aR)-5-terc-butilo-N-[(1R,2R)-2-(difluorometilo)-1-[[[(1-metilciclopropilo)sulfonilo]carbamoilo]ciclopropilo]-9-etilo-18,18-difluoro-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-

metanociclopropano[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono[nadecino[11,12-b]quinoxalina-8-carboxamida.

[0165]



[0166] Pasos 1 y 2. Preparación de **17-2**: Una mezcla de Intermedio **B4** (273 mg, 0,865 mmol), Intermedio **E3** (234 mg, 0,865 mmol) y carbonato de cesio (310 mg, 0,952 mmol) en MeCN (2,5 ml) se calentó a 85°C durante 36 horas. En un proceso alternativo, se utilizó DMF como disolvente. Se añadió agua (10 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir **17-1**, que se usó posteriormente sin purificación adicional o después de purificación por cromatografía. El residuo se trató con 35 equivalentes de 4 N HCl en dioxano a ta durante 2,5 horas. Tras la adición de éter dietílico, precipitó la sal hidrocloreuro de **17-2**. La sal se recogió mediante filtración al vacío y se secó a presión reducida (375 mg). En un proceso alternativo, la desprotección se realizó en presencia de MSA en tBuOAc y DCM. LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₀F₂N₃O₄: 450,2; encontrado: 450,1.

[0167] Paso 3. Preparación de **17-3**: mezcla A de **17-2** (370 mg, 0,761 mmol), intermedio **D11** (205 mg, 0,761 mmol), HATU (347 mg, 0,914 mmol) y DIPEA (0,795 ml, 4,57 mmol) en DMF (3 ml) se agitó a ta durante la noche. La mezcla se diluyó con 100 ml de agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La mezcla de producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 30%) para dar **17-3** (236 mg). En un proceso alternativo, se mezclaron **17-2** y el Intermedio **D11** con EDC y HOBT en presencia de NMM en DMF para dar **17-3**. LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₇H₅₁F₂N₄O₇: 701,4; encontrado: 701,3.

[0168] Paso 4. Preparación de **17-4**: Una solución de **17-3** (236 mg, 0,34 mmol) en DCE (67 ml) se desoxigenó con argón durante 40 minutos. Se añadió catalizador Zhan 1B (25 mg, 0,034 mmol, Strem) y la reacción se calentó en un baño de aceite a 100°C durante 40 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 5% a 65%) para dar **17-4** (229 mg). LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+F]⁺ calculado para C₃₅H₄₆FN₄O₇: 653,3; encontrado: 653,2.

[0169] Paso 5. Preparación de **17-5**: Una solución de **17-4** (229 mg, 0,34 mmol) en 50 ml de etanol se hidrogenó a 1 atm de gas hidrógeno sobre 220 mg de 10% en peso de Pd/C (húmedo) durante 2,5 horas. La filtración a través de Celite y la concentración a presión reducida dio un residuo bruto de **17-5** (184 mg). En un proceso alternativo, se hidrogenó **17-4** en gas hidrógeno en presencia de Rh. LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₄₉F₂N₄O₇: 675,4; encontrado: 675,3.

[0170] Paso 6. Preparación de **17-6**: Ester **17-5** (184 mg, 0,27 mmol) en 2 ml de DCM se trató con 1 ml de TFA y se agitó a ta durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró y luego se repartió entre agua y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para dar **17-6** (153 mg). LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₄₁F₂N₄O₇: 619,3; encontrado: 619,2.

[0171] Paso 7 Preparación del ejemplo **17**: mezcla A de ácido carboxílico **17-6** (153 mg, 0,247 mmol), Intermedio **A10** (90 mg, 0,297 mmol), HATU (113 mg, 0,297 mmol), DMAP (45 mg, 0,37 mmol) y DIPEA (0,215 ml, 1,24 mmol) en DMF (1,5 ml) se agitó a ta durante 40 minutos. La mezcla se diluyó con HCl acuoso 2 N (2 ml) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La mezcla de producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexanos: 30% - 95%) para dar el Ejemplo **17** (95 mg). Tiempo de recuperación de HPLC analítica: 8,79 min. LCMS-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₄₀H₅₃F₄N₆O₉S: 869,3; encontrado: 869,2. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,948 (br s, 1 H), 7,99 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,29 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1 H), 7,09 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,57 (br s, 1H), 5,97 (td, JH-F = 52 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 5,92 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5,322 (d, J = 9,6 Hz, 1 H), 4,42 (ap d, J = 7,2 Hz, 1 H), 4,40 (ap s, 1 H), 4,34 (ap d, J = 10 Hz, 1 H), 4,08 (dd, J = 12,0, 3,6 Hz, 1 H), 3,99 - 3,94 (m, 1 H), 3,96 (s, 3 H), 3,67 (m, 1 H), 2,52 (m, 2 H), 2,06 (m, 1 H), 1,93 (m, 2 H), 1,77 (m, 2H), 1,63 (m, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,56 - 1,42 (m, 4H), 1,25 (m, 1H), 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,09 (s, 9H), 1,10-0,93 (m, 2H), 0,85 (m, 2H), 0,69 (m, 1H), 0,49 (m, 1H).

Actividad biológica

Expresión y purificación de genotipo 1a, 2a, y 3 proteasas NS3

Generación de plásmidos de expresión de la proteasa NS3

[0172] La secuencia de codificación del dominio de proteasa NS3 del VHC de genotipo 1b (cepa con-1) se amplificó por PCR a partir de un plásmido que codifica el replicón I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET (Reblikon, Mainz, Alemania). El cebador 5'-PCR se diseñó para codificar una etiqueta de hexahistidina K3 N-terminal e insertar un sitio de escisión de proteasa del virus Etch del tabaco recombinante (rTEV) en el marco en la secuencia de codificación de NS3. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de expresión de la proteína pET28 (Invitrogen, Carlsbad, CA) produciendo p28-N6H-Tev-NS3 (181) 1b.

[0173] Las secuencias de codificación para el dominio de proteasa de HCV de genotipo 3 se amplificó mediante TA-PCR usando un Titan One tubo de TA-PCR Kit (Roche, Indianapolis, IN) y ARN extraído de suero humano positivo para VHC (BBI Diagnostics, MA) utilizando un kit de virus QIAmp UltraSens (Qiagen, Valencia, CA). Se diseñaron cebadores de PCR 5' para codificar etiquetas de hexahistidina N-terminales e insertar sitios de escisión de proteasa rTEV en marco en las secuencias codificantes de proteasa NS3. Los fragmentos de ADN resultantes se clonaron en pET28 produciendo los vectores de expresión p28-N6H-Tev-NS3 (181) 1a y p28-N6H-TevNS3 (181) 3, respectivamente.

Expresión de proteínas de proteasa NS3

[0174] Bacterias BL21AI (Invitrogen, Carlsbad, CA) se transformaron con expresión de vectores NS3 de genotipo 1b o 3 y se usaron para inocular un recipiente de fermentación 20 L (Sartorius BBI System Inc., Bethlehem, PA), que contiene 18 L de medio 2YT fresco suplementado con 50 mg/mL de kanamicina. Cuando las densidades celulares alcanzaron una OD₆₀₀ de 1, la temperatura de los cultivos se redujo de 37°C a 28°C y la inducción se inició

inmediatamente mediante la adición de concentraciones finales de ZnSO₄ 30 mM, L-arabinosa 14 mM e isopropilo β-D 1 mM de tiogalactósido (IPTG). Las células se recolectaron por centrifugación cuatro horas después de la inducción y se almacenaron como sedimentos congelados a -80°C antes de la purificación de la proteína NS3.

5 Purificación de proteasas NS3

Purificación de proteasa de NS3 de genotipo 1b

[0175] Los sedimentos celulares se descongelaron y se resuspendieron a 10 ml/g de células en tampón de lisis que contiene 50 mM pH tris 7,6, 300 mM de NaCl, 0,1% de 3-[(3-colamidopropilo)dimetilamonió]-1-propanosulfonato (CHAPS), glicerol al 5% y β-mercaptoetanol 2 mM. A continuación, las suspensiones celulares se sonicaron, se filtraron a través de una gasa y se pasaron tres veces a través de un microfluidizador a 18.000 libras/in². Los lisados resultantes se centrifugaron a 15500 rpm durante 45 minutos y los sobrenadantes se cargaron en una columna HisTrap HP (GE Lifesciences) preequilibrada con cinco volúmenes de tampón A de Ni (tris 50 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, CHAPS al 0,1%, 5 % de glicerol, β-mercaptoetanol 2 mM, imidazol-HCl 50 mM). Las proteínas se eluyeron con un gradiente de 0-100% de tampón A de Ni más imidazol-HCl 500 mM y se recogieron y combinaron las fracciones. El conjunto HisTrap se diluyó 1:10 con tampón SP-A (tris 50 mM pH 7,0, glicerol al 10%, ditiotretol (DTT) 2 mM) y se cargó en una columna HiTrap SP-HP (GE Lifesciences) equilibrada con tampón SP-A. La proteasa NS3 se eluyó con un gradiente de tampón SP-B al 0-100% (tampón SP-A más NaCl 1 M). Reservas concentradas de fracciones de SP que contienen NS3 se alícuotaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Purificación del Proteasa NS3 de Genotipo 3

[0176] Los sedimentos bacterianos obtenidos de la expresión de proteasa NS3 del VHC de Genotipo 3 se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris 25 mM, tampón pH 7,5 que contiene NaCl 150 mM y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM) y se pasó a través de un microfluidizador a 18.000 libras/in². Los lisados de células homogeneizadas se centrifugaron a 30.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los sedimentos de P1 resultantes se lavaron con tampón de lavado I (tris 25 mM, pH 7,5 que contiene CHAPS al 1%) seguido de centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los sedimentos de P2 resultantes se lavaron con tampón de lavado II (tampón CAPS 50 mM, pH 10,8, que contiene NaCl 2 M y urea 2 M) seguido de centrifugación a 30.000 x g durante minutos a 4°C. Los sedimentos de P3 resultantes se resuspendieron en tampón de solubilización (20 ml de tris 25 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 150 mM y urea 8 M) y se incubaron a 4°C durante una hora. Las proteínas solubilizadas se pasaron a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Se midieron las concentraciones de proteína y las soluciones se ajustaron a DTT 40 mM, se incubaron durante 30 minutos a 4°C y luego se diluyeron rápidamente en tampón de replegamiento (tris 25 mM, pH 8,5, guanidina-HCl 0,8 M, L-arginina 0,4 M, 10 mM ZnSO₄) mientras se agita. Las soluciones de proteínas se incubaron a 4°C durante la noche para permitir el replegamiento. Las proteasas replegadas se centrifugaron a 30.000 x g durante 10 minutos para eliminar los precipitados residuales. A continuación, se midieron las concentraciones finales de proteína y se dividieron en alícuotas de las proteasas NS3, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Determinación Ki de la proteasa NS3 de genotipos 1b y 3a.

[0177] El dominio de proteasa NS3 purificado (aminoácidos 1-181) del virus del genotipo 1b y 3a se generó como anteriormente. El sustrato depsipéptido fluorogénico desactivado internamente Ac-DED (Edans)-EEAbuΨ[COO]ASK(Dabcyl)-NH₂ y un péptido sintético que contiene los residuos del núcleo hidrófobo del cofactor de la proteína NS4A (KKGSWIVGRILSGRKK; péptido NS4A) se obtuvieron de Anaspec, Inc. (San José, CA). Otros productos químicos y bioquímicos eran de grado reactivo o mejor y se compraban a proveedores estándar.

[0178] Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente en tampón constituido por HEPES 50 mM, 40% de glicerol, 0,05% de Triton X-100, DTT 10 mM, y 10% de DMSO. Las soluciones de ensayo finales contenían 50 pM de proteasa NS3 genotipo 1b o 200 pM de proteasa genotipo 3a, péptido NS4A 20 mM y sustrato 4 mM (genotipo 1b) o sustrato 2 mM (genotipo 3a). Las concentraciones de inhibidor variaron de 100 nM a 5 pM en diluciones triples, y se incluyeron controles sin inhibidor.

[0179] Las diluciones del compuesto se realizaron en DMSO a 20 x concentración final. Las mezclas de reacción se prepararon en placas de ensayo de 96 pocillos. Se mezcló una solución de enzima y péptido NS4A en tampón de ensayo (volumen de 25 µl con ambos reactivos a de 4 x concentración final) con 45 µl de tampón de ensayo y 5 µl de inhibidor o DMSO y se preincubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inició mediante la adición de 25 µl de solución de sustrato a 4 x concentración final. Las placas se mezclaron vigorosamente durante 5-10 segundos y se dejó que las reacciones prosiguieran durante 90 minutos. La fluorescencia se midió cada 30 s entre 90 y 120 minutos de tiempo de reacción usando un lector de placas multimodo Tecan InfiniTe M1000 o PerkinElmer Envision con una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 490 nm.

[0180] Las velocidades se calcularon a partir de las curvas de progreso en estado estacionario, en el marco de tiempo de 90-120 minutos después de la adición del sustrato. Para determinar la *K_i*, se graficaron las tasas en función de la concentración de inhibidor y los datos se ajustaron con la ecuación 1 (Morrison, JF, Biochimica et Biophysica Acta

1969, 185, 269-286) para calcular K_{iapp} usando GraphPad Prism 5. La fracción activa de enzima se determinó mediante titulación del sitio activo con inhibidores potentes conocidos. K_i se calculó a partir de $K_{iapp}/(1 + [S]/K_m)$. Los resultados de K_i para los compuestos representativos para el genotipo 1b y 3a (**Ki 1B** y **Ki 3A**, respectivamente) se informan en la Tabla 1.

$$\frac{v}{v_0} = \frac{[E]_t - [I]_t - K_{iapp} + \sqrt{([E]_t - [I]_t - K_{iapp})^2 + 4[E]_t K_{iapp}}}{2[E]_t} \quad (1)$$

Evaluación de la actividad anti-VHC basada en células:

[0181] La potencia antiviral (CE_{50}) se determinó en ambos niveles subgenómicos estables. Líneas de células de replicón de VHC y células de replicón de VHC transitorias transfectadas. El término concentración media máxima eficaz (CE_{50}) se refiere a la concentración de un fármaco que induce una respuesta a mitad de camino entre la línea de base y el máximo después del tiempo de exposición especificado a continuación.

[0182] Se establecieron replicones de VHC subgenómicos estables para genotipo 1a, 1b, 2a, 3a y 4a en células derivadas de Huh-7 como se describe por Lohmann et al (Lohmann V, Korner F, Koch J, et al Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 1999; 285: 119-3). Cada línea celular estable contiene un replicón del VHC bicistrónico que codifica un gen indicador de luciferasa de *Renilla* humanizado (hRLuc) fusionado con un gen de resistencia a la neomicina seleccionable, seguido de un IRES de EMCV y la región codificante de NS3-NS5B del VHC. La selección de las células que expresan constitutivamente el replicón del VHC se logró en presencia del antibiótico de selección, neomicina (G418). La actividad luciferasa se midió como un marcador de los niveles de replicación del VHC intracelular.

[0183] El genotipo replicón 1a estable se derivó de la cepa H77 del VHC y contenían mutaciones adaptativas P1496L y S2204I. El replicón estable del genotipo 1b se derivó de la cepa del VHC Con1 y contenía las mutaciones adaptativas E1202G, T1280I y K1846T. El replicón estable del genotipo 2a se derivó de la cepa del VHC JFH-1 y no requirió mutaciones adaptativas. El replicón estable del genotipo 3a se derivó de la cepa del VHC S52 y contenía las mutaciones adaptativas P1121L, A1198T y S2210I (equivalente a S2204I en el genotipo 1). El replicón estable del genotipo 4a se derivó de la cepa del VHC ED43 y contenía las mutaciones adaptativas Q1691R y S2204I. Todas las líneas celulares de replicón se propagaron en células derivadas de Huh-7 y se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 0,5 mg/ml de G418.

[0184] Se establecieron replicones de HCV transfectados transitoriamente para las variantes resistentes D168A inhibidoras de proteasa del genotipo 1a, 1b, 3a y NS3/4a en genotipo 1b o R155K en genotipo 1a. Los replicones transfectados transitoriamente son también replicones subgenómicos bicistrónicos pero no contienen el marcador seleccionable de neomicina presente en replicones estables. Estos replicones codifican el poliovirus IRES seguido del gen informador hRLuc, el EMCV IRES y finalmente la región codificante NS3-NS5B del VHC. Los replicones de tipo silvestre del genotipo 1a (H77) y 1b (Con1) se derivaron de la misma cepa y contenían las mismas mutaciones adaptativas enumeradas anteriormente. El replicón transitorio del genotipo 3a se derivó de la cepa de VHC S52 como anteriormente, pero contenía mutaciones adaptativas P1112L, K1615E y S2210I ligeramente diferentes. Específicamente, la mutación adaptativa secundaria A1198T (A166T) en el dominio de proteasa del replicón del genotipo estable 3a se reemplazó con K1615E (K583E) en la helicasa NS3, sin efecto sobre la eficiencia de replicación. La eliminación de A166T ubicado en el dominio de proteasa minimiza el impacto de esta variante sobre los inhibidores que se dirigen al dominio de proteasa y representa un dominio de proteasa más cercano al tipo silvestre para el genotipo 3a. Se introdujeron replicones resistentes que codifican mutaciones inhibidoras de proteasa NS3/4 en el gen NS3 de tipo silvestre 1b o 1a mediante mutagénesis dirigida al sitio. Los ARN transcritos in vitro de todos los replicones transitorios se transfectaron en líneas celulares derivadas de Huh-7 vírgenes mediante electroporación. La actividad luciferasa se midió como un marcador para los niveles de replicación del VHC intracelular.

[0185] Para realizar los ensayos de CE_{50} , se dispensaron células de cada replicón del VHC en placas de 384 pocillos. Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se diluyeron en DMSO usando un instrumento de pipeteo automático. Se añadieron directamente a las células compuestos diluidos en serie tres veces utilizando un instrumento automatizado. Se utilizó DMSO como control negativo (disolvente; sin inhibición) y una combinación de tres inhibidores del VHC que incluía un inhibidor de proteasa; se utilizó un inhibidor de NS5A y un inhibidor de nucleósidos a concentraciones $> 100 \times CE_{50}$ como control positivo (inhibición del 100%). Setenta y dos horas más tarde, las células se lisaron y se cuantificó la actividad de luciferasa de *Renilla* según lo recomendado por el fabricante (Promega-Madison, WI). Se realizó una regresión no lineal para calcular los valores de CE_{50} .

[0186] Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2:

Tabla 1: Valores de actividad biológica para líneas celulares de replicones del VHC subgenónicos estables

Ejemplo	Ki1B (nM)	Ki3A (nM)	CE ₅₀ 1A RLUC* (nM)	CE ₅₀ 1B RLUC* (nM)	CE ₅₀ 2A RLUC* (nM)	CE ₅₀ 3A RLUC* (nM)	CE ₅₀ 4A RLUC* (nM)
17	0,04	0,06	3,9	3,3	3,7	15	2,9

*RLUC: luciferasa de *Renilla*

Tabla 2: Valores de actividad biológica para líneas celulares de replicones del VHC transfectadas de forma transitoria

	CE ₅₀ 3A WT* (nM)	CE ₅₀ 1A WT* (nM)	CE ₅₀ 1A R155K † (nM)	CE ₅₀ 1 B WT* (nM)	CE ₅₀ 1 B D168A ‡ (nM)
17	6,1	2,9	2,8	1,7	4,3

* P = tipo silvestre
† NS3/4a variantes resistentes al inhibidor de la proteasa R155K en el genotipo 1^a
‡ NS3/4a variantes resistentes al inhibidor de la proteasa D168A en el genotipo 1b

[0187] Los datos de las Tablas 1 y 2 representan un tiempo más de promedio de cada ensayo para cada compuesto. Para ciertos compuestos, se han realizado múltiples ensayos durante la vida del proyecto. Así, los datos reportados en las Tablas 1 y 2 incluyen los datos reportados en el documento de prioridad, así como los datos generados en el período intermedio.

Composiciones farmacéuticas

[0188] Lo siguiente ilustra formas de dosificación farmacéuticas representativas, que contienen un compuesto ("Compuesto X"), para uso terapéutico o profiláctico en seres humanos.

(i) Comprimido 1		mg/comprimido
Compuesto X=		100,0
Lactosa		77,5
Povidona		15,0
Croscarmelosa sódica		12,0
Celulosa microcristalina		92,5
Estearato de magnesio		<u>3,0</u>
		300,0
(ii) Comprimido 2		mg/comprimido
Compuesto X=		20,0
(ii) Comprimido 2		mg/comprimido
Almidón		50,0
Glicolato de almidón sódico		15,0
Estearato de magnesio		<u>5,0</u>
		500,0
(iii) Comprimido 2		mg/comprimido
Compuesto X=		10,0
Dióxido de silicio coloidal		1,5
Lactosa		465,5
Almidón pregelatinizado		120,0
Estearato de magnesio		<u>3,0</u>
		600,0
(iv) Inyectable (1 mg/ml)		mg/ml
Compuesto X = (forma de ácido libre)		1,0
Fosfato de sodio dibásico		12,0
Fosfato de sodio monobásico		0,7
Cloruro de sodio		4,5
1,0 N Solución de hidróxido de sodio		
(ajuste de pH a 7.0-7,5)		q.s.
Agua para inyección		q.s. ad 1 mL

[0189] Las formulaciones anteriores se pueden obtener mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica.

[0190] Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, patentes y documentos de patente se incorporan por referencia en el presente documento, como cuando esté incorporado individualmente por referencia. La invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, debe entenderse que se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones sin dejar de estar dentro del espíritu y alcance de la invención.

[0191] El uso de los términos "un", "una", "el" y "ella" y referencias similares en el contexto de esta descripción (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (p. ej., tal como, preferido, preferiblemente) proporcionado en el presente documento, está destinado simplemente a ilustrar más el contenido de la divulgación y no supone una limitación en el alcance de las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse en el sentido de que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la presente divulgación.

[0192] En este documento se describen realizaciones alternativas de la divulgación reivindicada, incluido el mejor modo conocido por los inventores para poner en práctica la invención reivindicada. De estos, las variaciones de las realizaciones descritas resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado (p. ej., alterando o combinando características o realizaciones), y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otra manera que la descrita específicamente en el presente documento.

[0193] Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la misma según lo permita la ley aplicable. Además, la invención abarca cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

[0194] El uso de valores numéricos individuales se indica como aproximaciones como si los valores estuvieran precedidos por la palabra "aproximadamente" o "alrededor de". De manera similar, los valores numéricos en los diversos rangos especificados en esta solicitud, a menos que se indique expresamente lo contrario, se expresan como aproximaciones como si los valores mínimo y máximo dentro de los rangos establecidos estuvieran ambos precedidos por la palabra "aproximadamente" o "alrededor de". De esta manera, pueden usarse variaciones por encima y por debajo de los rangos indicados para lograr sustancialmente los mismos resultados que los valores dentro de los rangos. Como se usa en este documento, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" cuando se refieren a un valor numérico tendrán sus significados simples y ordinarios a un experto en la materia con la que el tema descrito está más estrechamente relacionado o la técnica relevante para el rango o elemento en cuestión. El grado de ampliación desde el límite numérico estricto depende de muchos factores. Por ejemplo, algunos de los factores que se pueden considerar incluyen la criticidad del elemento y/o el efecto que una determinada cantidad de variación tendrá en el desempeño del tema reivindicado, así como otras consideraciones conocidas por los expertos en la materia. Como se usa en este documento, el uso de diferentes cantidades de dígitos significativos para diferentes valores numéricos no pretende limitar cómo el uso de las palabras "aproximadamente" o "alrededor de" servirá para ampliar un valor o rango numérico particular. Así, como cuestión general, "aproximadamente" o "alrededor de" amplían el valor numérico. Además, la descripción de los rangos está destinada a ser un rango continuo que incluye todos los valores entre los valores mínimo y máximo más la ampliación del rango proporcionada por el uso del término "aproximadamente" o "alrededor de". Por lo tanto, la enumeración de los rangos de valores en este documento está simplemente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se recitara individualmente en el presente.

[0195] Debe entenderse que cualquier rango, proporción y rango de proporción que pueda formarse o derivarse de cualquiera de los datos divulgados en este documento representan realizaciones adicionales de la presente divulgación y se incluyen como parte de la divulgación como si se establecieron explícitamente. Esto incluye rangos que se pueden formar que incluyen o no un límite superior y/o inferior finito. Por consiguiente, un experto en la técnica que esté más estrechamente relacionado con un intervalo, relación o intervalo de relaciones en particular apreciará que dichos valores se pueden derivar de forma inequívoca a partir de los datos aquí presentados.

LISTA DE SECUENCIAS

[0196]

<110> Gilead Sciences, Inc.

<120> INHIBIDORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

<130> PN816595EPB

5 <150> US 61/798,52
<151> 2013-03-15

10 <150> US 61/667,806
<151> 2012-07-03

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

15 <210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido NS4A

<400> 1

25 Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg
1 5 10 15
Lys Lys

30

35

40

45

50

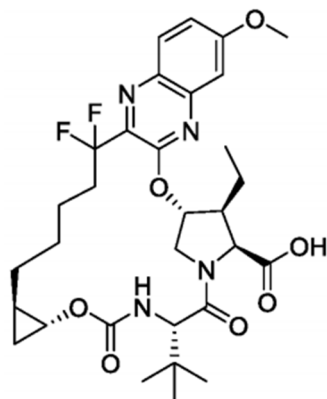
55

60

65

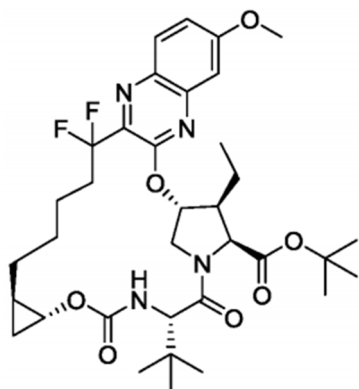
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:

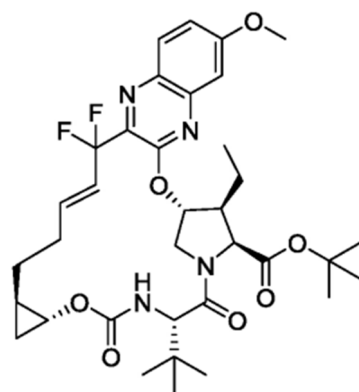


o una sal del mismo.

2. Un compuesto de fórmula:



3. Un compuesto de fórmula:



4. Un compuesto de fórmula:

5

10

15

