



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 15 420 T2** 2008.04.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 474 423 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 15 420.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA03/00091**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 700 745.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/064416**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.01.2003**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **07.08.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.11.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **08.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.04.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07D 417/14** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**C07K 4/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**2369970 01.02.2002 CA**

(73) Patentinhaber:

**Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218  
Ingelheim, DE**

(74) Vertreter:

**Kompter, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
64560 Riedstadt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR**

(72) Erfinder:

**LLINAS-BRUNET, Montse, Laval, Quebec H7S  
2G5, CA; BAILEY, Murray D., Laval, Quebec H7S  
2G5, CA; GHIRO, Elise, Laval, Quebec H7S 2G5,  
CA**

(54) Bezeichnung: **HETEROCYCLISCHE TRIPEPTIDE ALS HEPATITIS C-INHIBITOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verbindungen, Verfahren zu ihrer Synthese und Zusammensetzungen zur Behandlung der Hepatitis-C-Virusinfektion (HCV). Insbesondere liefert die vorliegende Erfindung Peptidanaloga und pharmazeutische Zusammensetzungen, enthaltend derartige Analoga zur Behandlung der HCV-Infektion.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Der Hepatitis-C-Virus (HCV) ist das hauptursächliche Mittel für Post-Transfusions- und ambulant erworbene ("community-acquired") Nicht-A-Nicht-B-Hepatitis weltweit. Es wird geschätzt, dass über 200 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert sind. Ein hoher Prozentsatz an Trägern wird chronisch infiziert, und viele gehen in chronische Lebererkrankungen, sogenannte chronische Hepatitis C, über. Diese Gruppe hat an sich ein hohes Risiko für schwere Lebererkrankungen, wie Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom und terminale Lebererkrankung, die zum Tod führt.

**[0003]** Der Mechanismus, durch welchen HCV virale Persistenz etabliert und eine hohe Rate chronischer Lebererkrankung verursacht, wurde nicht weitgehend aufgeklärt. Es ist nicht bekannt, wie HCV mit dem Wirts-Immunsystem interagiert und dieses umgeht. Zusätzlich müssen die Rollen von zellulären und humoralen Immunantworten beim Schutz gegen HCV-Infektion und -Erkrankung noch ermittelt werden. Immunglobuline wurden zur Prophylaxe von viraler Hepatitis in Zusammenhang mit Transfusion beschrieben, jedoch empfiehlt das Zentrum für Krankheitskontrolle (CDC) gegenwärtig keine Immunglobulinbehandlung für diesen Zweck. Das Fehlen einer effektiven Immunschutzantwort hemmt die Entwicklung eines Vakzins oder adäquater Prophylaxe-Maßnahmen nach Aussetzung, so dass in nächster Zeit die Hoffnungen fest auf antiviralen Eingriffen ruhen.

**[0004]** Verschiedene klinische Studien wurden mit dem Ziel der Identifizierung pharmazeutischer Mittel durchgeführt, die in der Lage sind, HCV-Infektion in Patienten, die mit chronischer Hepatitis C angesteckt sind, effektiv zu behandeln. Diese Studien haben die Verwendung von Interferon- $\alpha$ , allein oder in Kombination mit anderen antiviralen Mitteln, eingesetzt. Derartige Studien haben gezeigt, dass eine wesentliche Anzahl der Teilnehmer auf diese Therapien nicht reagieren, und von denen, die günstig reagieren, wurde festgestellt, dass ein großer Anteil nach Beendigung der Behandlung rückfällig wird.

**[0005]** Bis vor Kurzem war Interferon (IFN) die einzige verfügbare Therapie mit nachgewiesenem Nutzen, die für Patienten mit chronischer Hepatitis C klinisch bestätigt war. Jedoch ist die verzögerte Reaktionsrate klein und die Interferon-Behandlung induziert ebenfalls schwere Nebenwirkungen (d.h. Retinopathie, Thyroiditis, akute Pankreatitis, Depression), welche die Lebensqualität von behandelten Patienten vermindert. Jüngst wurde Interferon in Kombination mit Ribavirin für Patienten ohne Reaktion auf IFN allein bestätigt. Jedoch werden die durch IFN hervorgerufenen Nebenwirkungen mit dieser Kombinationstherapie nicht abgeschwächt. Pegylierte Formen von Interferonen, wie PEG-Intron<sup>®</sup> und Pegasys<sup>®</sup>, können offensichtlich teilweise diese schädlichen Nebenwirkungen angehen, aber antivirale Arzneimittel bleiben nach wie vor das Mittel der Wahl zur oralen Behandlung von HCV.

**[0006]** Daher besteht ein Bedarf zur Entwicklung effektiver antiviraler Mittel zur Behandlung von HCV-Infektion, welche die Beschränkungen existierender pharmazeutischer Therapien überwinden.

**[0007]** HCV ist ein Positiv-Strang-RNA-Hüllvirus aus der Flaviviridae-Familie. Das Einzelstrang-HCV-RNA-Genom ist etwa 9500 Nucleotide lang und weist ein einzelnes offenes Leseraster (ORF) auf, das ein einzelnes großes Polyprotein von etwa 3000 Aminosäuren kodiert. In infizierten Zellen wird dieses Polyprotein an mehreren Stellen durch zelluläre und virale Proteasen gespalten, um die strukturellen und nicht-strukturellen (NS) Proteine zu erzeugen. Im Falle von HCV wird die Erzeugung von reifen nicht-strukturellen Proteinen (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B) durch zwei virale Proteasen bewirkt. Die erste, bis jetzt kaum charakterisiert, spaltet an der NS2-NS3-Bindung (fortan bezeichnet als NS2/3-Protease); die zweite ist eine Serinprotease, die im N-terminalen Bereich von NS3 (NS3-Protease) enthalten ist und sämtliche der nachfolgenden Spaltungen stromabwärts von NS3 vermittelt, sowohl in cis an der NS3-NS4A-Spaltungsstelle als auch in trans für die verbliebenen NS4A-NS4B-, NS4B-NS5A-, NS5A-NS5B-Stellen. Das NS4A-Protein scheint multiplen Funktionen zu dienen und wirkt als ein Co-Faktor für die NS3-Protease und unterstützt möglicherweise die Membranlokalisation von NS3 und anderen viralen Replikasekomponenten. Die Komplexbildung der NS3-Protease mit NS4A scheint zur Ereignisverarbeitung notwendig und erhöht die proteolytische

Effizienz an sämtlichen Stellen. Das NS3-Protein zeigt ebenfalls Nucleosid-Triphosphatase- und RNA-Helikase-Aktivitäten. Die NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in die Replikation von HCV einbezogen ist.

**[0008]** Eine allgemeine Strategie für die Entwicklung von antiviralen Mitteln ist es, die viral kodierten Enzyme, die für die Replikation des Virus wesentlich sind, zu inaktivieren.

**[0009]** Nachfolgend ist eine Liste von Patentanmeldungen, die in den letzten paar Jahren veröffentlicht wurden, welche HCV-NS3-Protease-Inhibitor-Peptidanaloga offenbaren, die sich von den Verbindungen der vorliegenden Erfindung strukturell unterscheiden: GB 2 337 262; JP 10298151; JP 11126861; JP 11292840; JP 2001-103993; US 6 159 938; US 6 187 905; WO 97/43310; WO 98/17679; WO 98/22496; WO 98/46597; WO 98/46630; WO 99/38888; WO 99/50230; WO 99/64442; WO 99/07733; WO 99/07734; WO 00/09543; WO 00/09558; WO 00/20400; WO 00/59929; WO 00/31129; WO 01/02424; WO 01/07407; WO 01/16357; WO 01/32691; WO 01/40262; WO 01/58929; WO 01/64678; WO 01/74768; WO 01/77113; WO 01/81325; WO 02/08187; WO 02/08198; WO 02/08244; WO 02/08251; WO 02/08256; WO 02/18369; WO 02/60926 und WO 02/79234.

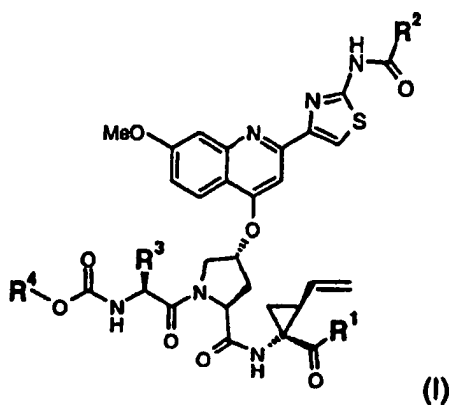
**[0010]** Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass sie Tripeptidverbindungen bereitstellt, die für NS3-Protease, ein wesentliches Enzym für die Replikation des Hepatitis C-Virus, inhibitorisch sind.

**[0011]** Ein weiterer Vorteil eines Aspekts der vorliegenden Erfindung besteht in der Tatsache, dass die Verbindungen speziell die NS3-Protease inhibieren und keine signifikante inhibitorische Aktivität gegenüber anderen Serinproteasen, wie Human-Leukozyt-Elastase (HLE), Schweinepankreaselastase (procine pancreatic elastase) (PPE) oder pankreatisches Rinderchymotrypsin, oder Cysteinproteasen, wie Human-Lebercathepsin B (Cat B), zeigen. Weiterhin werden die Verbindungen in Zellkultur aktiv und haben ein gutes pharmakokinetisches Profil *in vivo*.

**[0012]** Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass diese Verbindungen bereitstellt, die für Säuger oral bioverfügbar sind.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Im Umfang der Erfindung enthalten ist eine Verbindung der Formel (I):



worin R<sup>1</sup> Hydroxy oder NHSO<sub>2</sub>R<sup>1A</sup> darstellt, worin R<sup>1A</sup> (C<sub>1-8</sub>)-Alkyl, (C<sub>3-7</sub>)-Cycloalkyl oder {(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl-(C<sub>3-7</sub>)-cycloalkyl} darstellt, welche alle gegebenenfalls 1 bis 3mal mit Halogen, Cyano, Nitro, O-(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, Amido, Amino oder Phenyl substituiert sind, oder R<sup>1A</sup> C<sub>6</sub>- oder C<sub>10</sub>-Aryl darstellt, welches gegebenenfalls 1 bis 3mal mit Halogen, Cyano, Nitro, (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, O-(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, Amido, Amino oder Phenyl substituiert ist; R<sup>2</sup> t-Butyl, -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> oder -CH<sub>2</sub>-cyclopentyl darstellt; R<sup>3</sup> t-Butyl oder Cyclohexyl darstellt, und R<sup>4</sup> Cyclobutyl, Cyclopentyl oder Cyclohexyl darstellt; oder ein pharmazeutisch akzeptables bzw. annehmbares Salz davon.

**[0014]** Im Umfang dieser Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung enthalten, umfassend eine gegen Hepatitis C viral wirksame Menge einer Verbindung der Formel I oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz hiervon in Mischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trägermedium oder Hilfsstoff.

**[0015]** Gemäß einer Ausführungsform umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung weiterhin Interferon (pegyliert oder nicht) oder Ribavirin oder ein oder mehrere andere anti-HCV-Mittel oder ir-

gendeine Kombination der obigen.

**[0016]** Ein weiterer wichtiger Aspekt der Erfindung erleichtert die Behandlung einer viralen Hepatitis C-Infektion in einem Säuger durch Verabreichen einer gegen Hepatitis C viral wirksamen Menge einer Verbindung der Formel I, eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes hiervon oder einer Zusammensetzung, wie oben beschrieben, allein oder in Kombination mit einem oder mehreren von: Interferon (pegyliert oder nicht) oder Ribavirin oder einem oder mehreren anderen anti-HCV-Mitteln, zusammen oder getrennt verabreicht, an einen Säuger.

**[0017]** Ein weiterer wichtiger Aspekt der Erfindung erleichtert die Vorbeugung einer viralen Hepatitis C-Infektion in einem Säuger durch Verabreichen an den Säuger einer gegen Hepatitis C viral effektiven Menge einer Verbindung der Formel I, eines therapeutisch akzeptablen Salzes hiervon oder einer Zusammensetzung wie oben beschrieben, allein oder in Kombination mit einem oder mehreren von: Interferon (pegyliert oder nicht) oder Ribavirin oder einem oder mehreren anderen anti-HCV-Mitteln, die sämtlich zusammen oder getrennt verabreicht werden.

**[0018]** Ebenfalls im Umfang dieser Erfindung ist die Verwendung einer Verbindung der Formel I, wie hier beschrieben, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung von viraler Hepatitis C-Infektion.

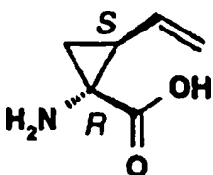
## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG VON BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

### Definitionen

**[0019]** Wie hier verwendet, gelten die nachfolgenden Definitionen, sofern nicht anders angegeben: Mit Bezug auf die Fälle, wo (R) oder (S) verwendet wird, um die absolute Konfiguration eines Substituenten oder asymmetrischen Zentrums einer Verbindung der Formel I zu bezeichnen, wird die Bezeichnung im Zusammenhang der gesamten Verbindung durchgeführt und nicht im Zusammenhang des Substituenten oder asymmetrischen Zentrums allein.

**[0020]** Die Bezeichnung "P1, P2 und P3", wie hier verwendet, bezieht sich auf die Position der Aminosäurereste, ausgehend vom C-terminalen Ende der Peptidanaloga und sich erstreckend in Richtung des N-Terminus (d.h. P1 bezieht sich auf Position 1 vom C-Terminus, P2: zweite Position vom C-Terminus etc.) (siehe Berger, A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London, Serien B257, 249-264 (1970)).

**[0021]** Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "(1R,2S)-Vinyl-ACCA" auf eine Verbindung der Formel:



d.h. (1R, 2S) 1-Amino-2-ethenylcyclopropylcarbonsäure.

**[0022]** Der Begriff "(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl", wie hier verwendet, entweder allein oder in Kombination mit einem weiteren Substituenten, bedeutet acyclische, gerad- oder verzweigt-kettige Alkyl-Substituenten, enthaltend 1 bis 6 Kohlenstoffatome, und umfasst beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, 1-Methylethyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl und Hexyl. Ähnlich bedeutet der Begriff "(C<sub>1-8</sub>)-Alkyl" ein acyclisches, gerad- oder verzweigt-kettiges Alkyl, enthaltend 1 bis 8 Kohlenstoffatome, z.B. Octyl.

**[0023]** Der Begriff "(C<sub>3-7</sub>)-Cycloalkyl", wie hier verwendet, entweder allein oder in Kombination mit einem weiteren Substituenten, bedeutet einen Cycloalkyl-Substituenten, enthaltend 3 bis 7 Kohlenstoffatome, und umfasst Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl und Cycloheptyl.

**[0024]** Der Begriff "{(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl-(C<sub>3-7</sub>)-cycloalkyl}", wie hier verwendet, bedeutet einen Cycloalkylrest, enthaltend 3 bis 7 Kohlenstoffatome, die direkt an einen Alkylrest, enthaltend 1 bis 6 Kohlenstoffatome, gebunden sind; beispielsweise Cyclopropylmethyl, Cyclopentylethyl, Cyclohexylmethyl, Cyclohexylethyl und Cycloheptylpropyl. Im Falle, wo R<sup>4A</sup> ein {(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl-(C<sub>3-6</sub>)-cycloalkyl} darstellt, wird diese Gruppe an die SO<sub>2</sub>-Gruppe über das (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl (d.h. den Alkylabschnitt) gebunden.

**[0025]** Der Begriff "C<sub>6</sub>- oder C<sub>10</sub>-Aryl", wie hier verwendet, entweder allein oder in Kombination mit einem wei-

teren Rest, bedeutet entweder eine aromatische monocyclische Gruppe, enthaltend 6 Kohlenstoffatome, oder eine aromatische bicyclische Gruppe, enthaltend 10 Kohlenstoffatome. Beispielsweise umfasst Aryl Phenyl, 1-Naphthyl oder 2-Naphthyl.

**[0026]** Der Begriff "O-(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl", wie hier verwendet, entweder allein oder in Kombination mit einem weiteren Rest, bedeutet den Rest -O-(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, worin Alkyl wie oben definiert ist, enthaltend bis zu 6 Kohlenstoffatome, und umfasst Methoxy, Ethoxy, Propoxy, 1-Methylethoxy, Butoxy und 1,1-Dimethylethoxy. Der letztere Rest ist üblicherweise als tert-Butoxy bekannt.

**[0027]** Der Begriff "Halo", wie hier verwendet, bedeutet einen Halogen-Substituenten, ausgewählt aus Brom, Chlor, Fluor oder Iod.

**[0028]** Der Begriff "pharmazeutisch akzeptables Salz" bedeutet ein Salz oder eine Verbindung der Formel (I), die im Umfang einer stimmigen medizinischen Beurteilung zur Verwendung in Kontakt mit dem Gewebe von Menschen und niederen Tieren ohne unerwartete Toxizität, Reizung, allergische Reaktion und dergleichen geeignet ist und mit einem vernünftigen Nutzen/Risiko-Verhältnis vereinbar ist, im Allgemeinen Wasser- oder öllöslich oder dispergierbar und für ihre beabsichtigte Verwendung wirksam ist. Der Begriff schließt pharmazeutisch akzeptable Säureadditionssalze und pharmazeutisch akzeptable Basenadditionssalze ein. Listen der geeigneten Salze werden z.B. gefunden in S.M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, S. 1-19.

**[0029]** Der Begriff "pharmazeutisch akzeptables Säureadditionssalz" bedeutet jene Salze, welche die biologische Wirksamkeit und Eigenschaften der freien Basen behalten, und die biologisch oder in anderer Weise nicht unerwünscht sind, gebildet mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Sulfaminsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure und dergleichen, und organische Säuren, wie Essigsäure, Trifluoressigsäure, Adipinsäure, Ascorbinsäure, Aspartamsäure, Benzolsulfonsäure, Benzoessäure, Buttersäure, Camphersäure, Camphersulfonsäure, Zimtsäure, Citronensäure, Digluconsäure, Ethansulfonsäure, Glutaminsäure, Glykolsäure, Glycerophosphorsäure, Hemisulfinsäure, Hexansäure, Ameisensäure, Fumarsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure (Isethionsäure), Milchsäure, Hydroxymaleinsäure, Äpfelsäure, Malonsäure, Mandelsäure, Mesitylsulfonsäure, Methansulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure, Nicotinsäure, 2-Naphthalinsulfonsäure, Oxalsäure, Pamoasäure (Embonsäure), Pektinsäure, Phenylessigsäure, 3-Phenylpropionsäure, Pivalinsäure, Propionsäure, Pyruvinsäure, Salicylsäure, Stearinsäure, Bernsteinsäure, Sulfanilsäure, Weinsäure, p-Toluolsulfonsäure, Undecansäure und dergleichen.

**[0030]** Der Begriff "pharmazeutisch akzeptables Basenadditionssalz" bedeutet jene Salze, welche die biologische Wirksamkeit und Eigenschaften der freien Säuren behalten und die biologisch oder in anderer Weise nicht unerwünscht sind, gebildet mit anorganischen Basen, wie Ammoniak oder Hydroxid, Carbonat oder Bicarbonat von Ammonium, oder einem Metallkation, wie Natrium, Kalium, Lithium, Calcium, Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Mangan, Aluminium und dergleichen. Besonders bevorzugt sind die Ammonium-, Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesiumsalze. Salze, abgeleitet von pharmazeutisch akzeptablen organischen nicht-toxischen Basen, umfassen Salze von primären, sekundären und tertiären Aminen, quaternäre Aminverbindungen, substituierte Amine, einschließlich natürlich auftretender substituierter Amine, cyclische Amine und basische Ionen-Austauschharze, wie Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Isopropylamin, Tripropylamin, Tributylamin, Ethanolamin, Diethanolamin, 2-Dimethylaminoethanol, 2-Diethylaminoethanol, Dicyclohexylamin, Lysin, Arginin, Histidin, Koffein, Hydrabamin, Cholin, Betain, Ethylendiamin, Glucosamin, Methylglucamin, Theobromin, Purine, Piperazin, Piperidin, N-Ethylpiperidin, Tetramethylammoniumverbindungen, Tetraethylammoniumverbindungen, Pyridin, N,N-Dimethylanilin, N-Methylpiperidin, N-Methylmorpholin, Dicyclohexylamin, Dibenzylamin, N,N-Dibenzylphenethylamin, 1-Ephenamin, N,N'-Dibenzylethylendiamin, Polyaminharze und dergleichen. Besonders bevorzugte organische nicht-toxische Basen sind Isopropylamin, Diethylamin, Ethanolamin, Trimethylamin, Dicyclohexylamin, Cholin und Coffein.

**[0031]** Der Begriff "antivirales Mittel", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Bildung und/oder Replikation eines Virus in einem Säuger zu inhibieren. Dies umfasst Mittel, die entweder in den Wirt oder in die viralen Mechanismen, die zur Bildung und/oder Replikation eines Virus in einem Säuger notwendig sind, eingreifen. Antivirale Mittel umfassen beispielsweise Ribavirin, Amantadin, VX-497 (Merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), Levovirin, Virmadin, Ceplene (Maxamine), XTL-001 und XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals).

**[0032]** Der Begriff "andere anti-HCV-Mittel", wie hier verwendet, bedeutet jene Mittel, die zur Verminderung oder Vorbeugung des Fortschreitens der mit Hepatitis C in Zusammenhang stehenden Erkrankungssympto-

men effektiv sind. Derartige Mittel können ausgewählt werden aus: antiviralen Mitteln, immunmodulatorischen Mitteln, Inhibitoren der HCV-NS3-Protease, Inhibitoren der HCV-Polymerase oder Inhibitoren eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus.

**[0033]** Der Begriff "immunmodulatorisches Mittel", wie hier verwendet, bedeutet jene Mittel (Verbindungen oder biologische Mittel), die zur Erhöhung oder Potenzierung der systemischen Immunantwort in einem Säuger wirksam sind. Immunmodulatorische Mittel umfassen beispielsweise Klasse I-Interferone (wie  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - und Omega-Interferone, tau-Interferone, Konsensus-Interferone und Asialo-Interferone), Klasse II-Interferone (wie  $\gamma$ -Interferone) und pegylierte Interferone.

**[0034]** Der Begriff "Inhibitor der HCV-NS3-Protease", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Funktion der HCV-NS3-Protease in einem Säuger zu inhibieren. Inhibitoren der HCV-NS3-Protease umfassen beispielsweise jene Verbindungen, die in der WO 99/07733, der WO 99/07734, der WO 00/09558, der WO 00/09543, der WO 00/59929 oder der WO 02/060926 beschrieben sind, dem klinischen Kandidaten von Boehringer Ingelheim, bezeichnet als BILN 2061, und dem vorentwickelten Kandidaten von Vertex/Eli Lilly, bezeichnet als VX-950 oder LY-570310. Speziell die Verbindungen #2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 18, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 55, 59, 71, 91, 103, 104, 105, 112, 113, 114, 115, 116, 120, 122, 123, 124, 125, 126 und 127, die in der Tabelle auf den Seiten 224 bis 226 in der WO 02/060926 offenbart sind, können in Kombination mit den Verbindungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0035]** Der Begriff "Inhibitor der HCV-Polymerase", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Funktion einer HCV-Polymerase in einem Säuger zu inhibieren. Dies umfasst beispielsweise Inhibitoren von HCV-NS5B-Polymerase. Inhibitoren von HCV-Polymerase umfassen nicht-Nucleoside, beispielsweise jene Verbindungen, beschrieben in:

- US-Anmeldung Nr. 10/198 680, welche der PCT/CA02/01127 entspricht, beide eingereicht am 18. Juli 2002 (Boehringer Ingelheim),
- US-Anmeldung Nr. 10/198 384, welche der PCT/CA02/01128 entspricht, beide eingereicht am 18. Juli 2002 (Boehringer Ingelheim),
- US-Anmeldung Nr. 10/198 259, welche der PCT/CA02/01129 entspricht, beide eingereicht am 18. Juli 2002 (Boehringer Ingelheim),
- WO 02/100846 A1 und WO 02/100851 A2 (beide Shire),
- WO 01/85172 A1 und WO 02/098424 A1 (beide GSK),
- WO 00/06529 und WO 02/06246 A1 (beide Merck),
- WO 01/47883 und WO 03/000254 (beide Japan Tobacco) und
- EP 1 256 628 A2 (Agouron).

**[0036]** Weiterhin umfassen andere Inhibitoren der HCV-Polymerase Nucleosid-Analoga, beispielsweise jene Verbindungen, beschrieben in:

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

**[0037]** Spezifische Beispiele von Inhibitoren einer HCV-Polymerase umfassen JTK-002, JTK-003 und JTK-109 (Japan Tobacco).

**[0038]** Der Begriff "Inhibitor eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Bildung und/oder Replikation von HCV in einem Säuger zu inhibieren, anders als durch Inhibieren der Funktion der HCV-NS3-Protease. Dies umfasst Mittel, welche in entweder den Wirt oder den HCV-viralen Mechanismen, die zur Bildung und/oder Replikation von HCV in einem Säuger notwendig sind, eingreifen. Inhibitoren eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus umfassen beispielsweise Mittel, die ein Ziel, ausgewählt aus einer Helikase, einer HCV-NS2/3-Protease und einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) inhibieren. Ein spezifisches Beispiel von Inhibitoren eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus umfasst ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals).

**[0039]** Der Begriff "HIV-Inhibitor", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Bildung und/oder Replikation von HIV in einem Säuger zu inhibieren. Dies umfasst Mittel, die entweder in den Wirt oder in die viralen Mechanismen, die zur Bildung und/oder Replikation von HIV in einem Säuger notwendig sind, eingreifen. HIV-Inhibitoren umfassen beispielsweise nucleosidische Inhibitoren, nicht-nucleosidische Inhibitoren, Proteaseinhibitoren, Fusionsinhibitoren und Integraseinhibitoren.

**[0040]** Der Begriff "HAV-Inhibitor", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Bildung und/oder Replikation von HAV in einem Säuger zu inhibieren. Dies umfasst Mittel, die entweder in den Wirt oder in die viralen Mechanismen, die zur Bildung und/oder Replikation von HAV in einem Säuger notwendig sind, eingreifen. HAV-Inhibitoren umfassen Hepatitis A-Vakzine, beispielsweise Havrix® (GlaxoSmithKline), VAQTA® (Merck) und Avaxim® (Aventis Pasteur).

**[0041]** Der Begriff "HBV-Inhibitor", wie hier verwendet, bedeutet ein Mittel (Verbindung oder biologisches Mittel), das wirksam ist, die Bildung und/oder Replikation von HBV in einem Säuger zu inhibieren. Dies umfasst Mittel, die entweder in den Wirt oder in die viralen Mechanismen, die zur Bildung und/oder Replikation von HBV in einem Säuger notwendig sind, eingreifen. HBV-Inhibitoren umfassen beispielsweise Mittel, die HBV-virale DNA-Polymerase inhibieren, oder HBV-Vakzine. Spezifische Beispiele von HBV-Inhibitoren umfassen Lamivudine (Epivir-HBV®), Adefovir Dipivoxil, Entecavir, FTC (Coviracil®), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudine®), AM365 (Amrad), Ldt (Telbivudine), Monoval-LdC (Valtorcitabine), ACH-126,443 (L-Fd4C) (Achillion), MCC478 (Eli Lilly), Racivir (RCV), Fluoro-L- und -D-Nucleoside, Robustaflavone, ICN 2001-3 (ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001 (XTL), Imino-Zucker (Nonyl-DNJ) (Synergy), HepBzyme; und immunmodulatorische Produkte, wie: Interferon- $\alpha$  2b, HE2000 (Hollis-Eden), Theradigm (Epimmune), EHT899 (Enzo Biochem), Thymosin- $\alpha$ -1 (Zadaxin®), HBV DNA-Vakzin (PowderJect), HBV DNA-Vakzin (Jefferson Center), HBV-Antigen (OraGen), Bay-Hep B® (Bayer), Nabi-HB® (Nabi) und anti-Hepatitis B (Cangene); und HBV-Vakzinprodukte, wie die folgenden: Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac.

**[0042]** Der Begriff "Klasse I-Interferon", wie hier verwendet, bedeutet ein Interferon, ausgewählt aus der Gruppe von Interferonen, die alle an den Rezeptor-Typ I binden. Dies umfasst sowohl natürliche als auch synthetisch produzierte Klasse I-Interferone. Beispiele von Klasse I-Interferone umfassen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, Omega-Interferone, tau-Interferone, Konsensus-Interferone, Asialo-Interferone.

**[0043]** Der Begriff "Klasse II-Interferon", wie hier verwendet, bedeutet ein Interferon, ausgewählt aus einer Gruppe von Interferonen, die sämtlich an den Rezeptor Typ II binden. Beispiele von Klasse II-Interferonen umfassen  $\gamma$ -Interferone.

**[0044]** Spezifisch bevorzugte Beispiele einiger dieser Mittel sind nachfolgend aufgelistet:

- antivirale Mittel: Ribavirin und Amantadin;
- immunmodulatorische Mittel: Klasse I-Interferone, Klasse II-Interferone und pegylierte Interferone;
- Inhibitor eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus, das ein Ziel inhibiert, ausgewählt aus: NS3-Helikase, HCV-NS2/3-Protease oder interner Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES);
- HIV-Inhibitoren: nucleosidische Inhibitoren, nicht-nucleosidische Inhibitoren, Proteaseinhibitoren, Fusionsinhibitoren und Integraseinhibitoren; oder
- HBV-Inhibitoren: Mittel, die HBV-virale DNA-Polymerase inhibieren, oder ein HBV-Vakzin.

**[0045]** Wie oben diskutiert, ist eine Kombinationstherapie beabsichtigt, worin eine Verbindung der Formel (1) oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz hiervon mit mindestens einem weiteren Mittel zusammen verabreicht wird, das ausgewählt wird aus: einem antiviralen Mittel, einem immunmodulatorischen Mittel, einem weiteren Inhibitor von HCV-NS3-Protease, einem Inhibitor von HCV-Polymerase, einem Inhibitor eines weiteren Ziels im HCV-Lebenszyklus, einem HIV-Inhibitor, einem HAV-Inhibitor sowie einem HBV-Inhibitor. Beispiele derartiger Mittel werden in der obigen Definitionssektion bereitgestellt. Diese zusätzlichen Mittel können mit den Verbindungen dieser Erfindung kombiniert werden, um eine einzelne pharmazeutische Dosierungsform zu schaffen. Alternativ können diese zusätzlichen Mittel getrennt an den Patienten als Teil einer multiplen Dosierungsform, beispielsweise unter Verwendung eines Kits, verabreicht werden. Derartige zusätzliche Mittel können dem Patienten vor, während oder nach der Verabreichung einer Verbindung der Formel (1) oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes hiervon verabreicht werden.

**[0046]** Wie hier verwendet bedeutet der Begriff "Behandlung" die Verabreichung einer Verbindung oder Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung, um Symptome der Hepatitis C-Erkrankung zu milder oder zu eliminieren und/oder die virale Belastung in einem Patienten zu reduzieren.

**[0047]** Wie hier verwendet bedeutet der Begriff "Vorbeugung" bzw. "Verhinderung" die Verabreichung einer Verbindung oder Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung nach Ansteckung des Individuums mit dem Virus aber vor dem Erscheinen der Symptome der Erkrankung und/oder vor der Feststellung des Virus im Blut.

## Bevorzugte Ausführungsformen

**[0048]** Bevorzugt sind Verbindungen der Formel 1 wie oben definiert, worin  $R^1$  Hydroxy,  $\text{NHSO}_2\text{Me}$ ,  $\text{NHSO}_2\text{-Cyclopropyl}$  oder  $\text{NHSO}_2\text{Ph}$  darstellt. Noch bevorzugter stellt  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Me}$  oder Hydroxy dar. Am meisten bevorzugt ist  $R^1$  Hydroxy.

**[0049]** Bevorzugt sind Verbindungen der Formel 1 wie oben definiert, worin  $R^2$  t-Butyl oder  $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  darstellt. Bevorzugter ist  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ .

**[0050]** Bevorzugt ist  $R^3$  t-Butyl.

**[0051]** Bevorzugt sind Verbindungen der Formel 1 wie oben definiert, wo  $R^4$  Cyclopentyl oder Cyclohexyl darstellt. Bevorzugter ist  $R^4$  Cyclopentyl.

**[0052]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1 wie oben definiert, worin  $R^1$  Hydroxy ist,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist,  $R^3$  t-Butyl ist und  $R^4$  Cyclopentyl ist.

**[0053]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt,  $R^2$  und  $R^3$  jeweils t-Butyl sind und  $R^4$  Cyclopentyl ist.

**[0054]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist,  $R^3$  Cyclohexyl ist und  $R^4$  Cyclopentyl ist.

**[0055]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist und  $R^3$  und  $R^4$  jeweils Cyclohexyl sind.

**[0056]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt,  $R^2$  Cyclopentylmethyl ist,  $R^3$  t-Butyl ist und  $R^4$  Cyclobutyl ist.

**[0057]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist,  $R^3$  t-Butyl ist und  $R^4$  Cyclobutyl ist.

**[0058]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Me}$  darstellt,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist,  $R^3$  t-Butyl ist und  $R^4$  Cyclopentyl ist.

**[0059]** Noch bevorzugter ist eine Verbindung der Formel 1, worin  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Ph}$  darstellt,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  ist,  $R^3$  t-Butyl ist und  $R^4$  Cyclopentyl ist.

**[0060]** Gemäß einer alternativen Ausführungsform kann die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung zusätzlich ein weiteres anti-HCV-Mittel umfassen. Beispiele von anti-HCV-Mitteln umfassen  $\alpha$ -(alpha)-,  $\beta$ -(beta)-,  $\delta$ -(delta)-,  $\gamma$ -(gamma)-, tau- oder  $\omega$ -(omega)-Interferon, Ribavirin und Amantadin.

**[0061]** Gemäß einer anderen alternativen Ausführungsform kann die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung zusätzlich einen weiteren Inhibitor von HCV-NS3-Protease umfassen.

**[0062]** Gemäß einer anderen alternativen Ausführungsform kann die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung zusätzlich einen Inhibitor von HCV-Polymerase umfassen.

**[0063]** Gemäß noch einer anderen alternativen Ausführungsform kann die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung zusätzlich einen Inhibitor weiterer Ziele im HCV-Lebenszyklus umfassen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Helikase, NS2/3-Protease oder interner ribosomaler Eintrittsstelle (IRES).

**[0064]** Die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung kann oral, parenteral oder über ein implantiertes Reservoir verabreicht werden. Orale Verabreichung oder Verabreichung durch Injektion ist bevorzugt. Die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung kann irgendwelche herkömmlichen nicht-toxischen pharmazeutisch akzeptablen Träger, Hilfsstoffe oder Vehikel enthalten. In einigen Fällen kann der pH-Wert der Formulierung mit pharmazeutisch akzeptablen Säuren, Basen oder Puffer eingestellt werden, um die Stabilität der formulierten Verbindung oder ihrer Freisetzungsform zu erhöhen. Der Begriff parenteral, wie hier verwendet, umfasst subkutane, intrakutane, intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle, intrasynoviale, intrasternale, intrathekale und intraläsionale Injektions- oder Infusionstechniken.

**[0065]** Die pharmazeutische Zusammensetzung kann in Form einer steril injizierbaren Zubereitung, beispielsweise als steril injizierbare wässrige oder ölhaltige Suspension vorliegen. Diese Suspension kann gemäß im Stand der Technik bekannter Techniken formuliert werden, unter Verwendung geeigneter Dispergier- oder Benetzungsmittel (wie beispielsweise Tween 80) und Suspensionsmittel.

**[0066]** Die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung kann oral in irgendeiner oral akzeptablen Dosierungsform verabreicht werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kapseln, Tabletten und wässrige Suspensionen und Lösungen. Im Falle von Tabletten zur oralen Verwendung umfassen Träger, die üblicherweise verwendet werden, Lactose und Maisstärke. Schmiermittel, wie Magnesiumstearat, werden typischerweise ebenfalls zugegeben. Zur oralen Verabreichung in einer Kapselform umfassen verwendbare Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke. Wenn wässrige Suspensionen oral verabreicht werden, wird der Wirkstoff mit Emulgier- und Suspensionsmitteln kombiniert. Wenn gewünscht, können bestimmte Süßungs- und/oder Aroma- und/oder farbgebende Mittel zugefügt werden.

**[0067]** Andere geeignete Vehikel oder Träger für die oben angeführten Formulierungen und Zusammensetzungen können in pharmazeutischen Standardtexten gefunden werden, z.B. in "Remington's Pharmaceutical Sciences", The Science and Practice of Pharmacy, 19. Ausgabe, Mack Publishing Company, Esston, Penn. (1995).

**[0068]** Dosierungsniveaus zwischen etwa 0,01 und etwa 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugt zwischen etwa 0,1 und etwa 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag, der Protease-Inhibitorverbindung, die hier beschrieben wird, sind in einer Monotherapie zur Vorbeugung und Behandlung von HCV-vermittelter Erkrankung verwendbar. Typischerweise wird die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Erfindung von etwa ein- bis etwa fünfmal pro Tag oder alternativ als kontinuierliche Infusion verabreicht. Derartige Verabreichung kann als eine chronische oder akute Therapie verwendet werden. Die Menge an Wirkstoff, die mit den Trägermaterialien kombiniert werden kann, um eine einzelne Dosierungsform zu erzeugen, variiert abhängig vom behandelten Wirt und dem speziellen Verabreichungsweg. Eine typische Zubereitung enthält etwa 5 bis etwa 95% Wirkverbindung (Gew./Gew.). Bevorzugt enthalten derartige Zubereitungen etwa 20 bis etwa 80% aktive Verbindung.

**[0069]** Wie der Fachmann im Stand der Technik schätzen wird, können geringere oder höhere Dosierungen als die oben angegebenen erforderlich sein. Spezifische Dosierungs- und Behandlungskuren für irgendeinen speziellen Patienten hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab, einschließlich der Aktivität der eingesetzten spezifischen Verbindung, dem Alter, Körpergewicht, allgemeinem Gesundheitszustand, Geschlecht, Ernährung, Verabreichungszeit, Ausscheidungsrate, Arzneistoffkombination, der Schwere und dem Verlauf der Infektion, der Patientendisposition gegenüber der Infektion und der Beurteilung des behandelnden Arztes. Im Allgemeinen wird die Behandlung mit kleinen Dosierungen, im Wesentlichen kleiner als die optimale Dosis des Peptids, begonnen. Hiernach wird die Dosierung in kleinen Schritten erhöht, bis die optimale Wirkung unter den gegebenen Umständen erreicht wird. Im Allgemeinen wird die Verbindung am erwünschtesten bei einem Konzentrationsniveau verabreicht, das im Allgemeinen antiviral wirksame Ergebnisse liefert, ohne irgendwelche schädlichen oder nachteiligen Nebenwirkungen hervorzurufen.

**[0070]** Wenn die Zusammensetzung dieser Erfindung eine Kombination einer Verbindung der Formel I und ein oder mehrere zusätzliche therapeutische oder prophylaktische Mittel umfasst, sollten sowohl die Verbindung als auch das zusätzliche Mittel mit Dosierungsniveaus zwischen etwa 10 und 100% und bevorzugt zwischen etwa 10 und 80% der Dosierung, die normalerweise in einer Monotherapie verabreicht wird, vorliegen.

**[0071]** Wenn diese Verbindungen oder ihre pharmazeutisch akzeptablen Salze zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger formuliert werden, kann die resultierende Zusammensetzung in vivo an Säuger, wie Menschen, verabreicht werden, um HCV-NS3-Protease zu inhibieren, oder die HCV-Virusinfektion zu behandeln oder dieser vorzubeugen. Eine derartige Behandlung kann ebenfalls unter Verwendung einer Verbindung dieser Erfindung in Kombination mit Mitteln erreicht werden, die umfassen, aber nicht beschränkt sind auf  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\omega$ -, tau- oder  $\gamma$ -Interferon, Ribavirin, Amantadin; andere Inhibitoren von HCV-NS3-Protease; Inhibitoren von HCV-Polymerase, Inhibitoren von anderen Zielen im HCV-Lebenszyklus, welche umfassen aber nicht beschränkt sind auf Helikase, NS2/3-Protease oder interner ribosomaler Eintrittsstelle (I-RES), oder Kombinationen hiervon. Die zusätzlichen Mittel können mit Verbindungen dieser Erfindung kombiniert werden, um eine einzelne Dosierungsform zu schaffen. Alternativ können diese zusätzlichen Mittel getrennt an einen Säuger als Teil einer multiplen Dosierungsform verabreicht werden.

**[0072]** Demgemäß erleichtert ein weiterer Aspekt dieser Erfindung die Inhibierung von HCV-NS3-Protea-

se-Aktivität in einem Säuger durch Verabreichung einer Verbindung der Formel I.

**[0073]** In einem bevorzugten Aspekt wird die NS3-Protease-Aktivität des Hepatitis C-Virus-infizierten Säugers abgesenkt.

**[0074]** Wenn die pharmazeutische Zusammensetzung nur eine Verbindung dieser Erfindung als die aktive Komponente umfasst, können derartige Verfahren zusätzlich den Schritt des Verabreichens eines Mittels an den Säuger umfassen, ausgewählt aus einem immunmodulatorischen Mittel, einem antiviralen Mittel, einem HCV-NS3-Protease-Inhibitor, einem Inhibitor von HCV-Polymerase oder einem Inhibitor eines anderen Ziels im HCV-Lebenszyklus, wie Helikase, NS2/3-Protease oder IRES. Ein derartiges zusätzliches Mittel kann dem Säuger vor, während oder nach der Verabreichung der Zusammensetzung dieser Erfindung verabreicht werden.

**[0075]** Eine Verbindung der Formel 1, wie hier dargestellt, kann ebenfalls als Laborreagenz verwendet werden. Eine Verbindung dieser Erfindung kann ebenfalls verwendet werden, um virale Kontamination von Materialien zu behandeln oder vorzubeugen, und daher das Risiko einer viralen Infektion im Labor oder von medizinischem Personal oder Patienten, welche mit derartigen Materialien in Kontakt kommen, zu reduzieren (z.B. Blut, Gewebe, Operationsinstrumente und -handschuhe, Laborinstrumente und -handschuhe und Blutsammelvorrichtungen und Materialien).

**[0076]** Eine Verbindung der Formel 1, wie hier dargestellt, kann ebenfalls als Forschungsreagenz eingesetzt werden. Eine Verbindung von Formel 1 kann ebenfalls als positive Kontrolle verwendet werden, um zellbasierte Ersatztests oder virale in vivo- oder in vitro-Replikationstests zu validieren.

**[0077]** Weitere Einzelheiten der Erfindung werden in den nachfolgenden Beispielen veranschaulicht, die als nicht-beschränkend im Hinblick auf die beigefügten Ansprüche verstanden werden.

#### BEISPIELE

**[0078]** Temperaturen werden in Grad Celcius angegeben. Lösungsprozentwerte drücken ein Gewicht-zu-Volumen-Verhältnis aus und Lösungsverhältnisse drücken ein Volumen-zu-Volumen-Verhältnis aus, sofern nicht anders angegeben. Kernmagnetresonanz(NMR)-Spektren wurden auf einem Bruker 400 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) werden in ppm angegeben. Flash-Chromatographie wurde auf Silikagel ( $\text{SiO}_2$ ) gemäß der Still's-Flash-Chromatographietechnik (W.C. Still et al., J. Org. Chem. (1978), 43, 2923) durchgeführt.

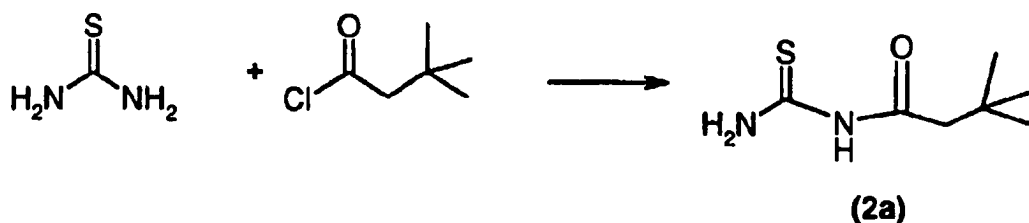
**[0079]** In den Beispielen verwendete Abkürzungen umfassen: DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DCM: Dichlormethan; DIEA: Diisopropylethylamin; DIPEA: Diisopropylethylamin; DMF: N,N-Dimethylformamid; DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin; EtOAc: Ethylacetat; HATU: [O-7-Azabenzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat; HPLC: Hochleistungs-Flüssigchromatographie; MS: Massenspektrometrie (MALDI-TOF: Matrix unterstützte Laserdisorptions-Ionisations-Flugzeit; FAB: Fast Atom Bombardment); Me: Methyl; MeOH: Methanol; Ph: Phenyl; R.T.: Raumtemperatur (18 bis 22°C); tert-Butyl oder t-Butyl: 1,1-Dimethylethyl; Tbg: tert-Butylglycin; tert-Leucin; TFA: Trifluoressigsäure; und THF: Tetrahydrofuran.

#### Synthese von Verbindungen der Formel (I):

**[0080]** Im Allgemeinen werden die Verbindungen der Formel 1 und Zwischenprodukte hiervon durch bekannte Verfahren unter Verwendung von Reaktionsbedingungen, die bekannt sind, um für die Reaktanten geeignet zu sein, hergestellt. Mehrere derartiger Verfahren sind in der WO 00/09543, der WO 00/09558 und dem US-Patent Nr. 6 323 180 offenbart.

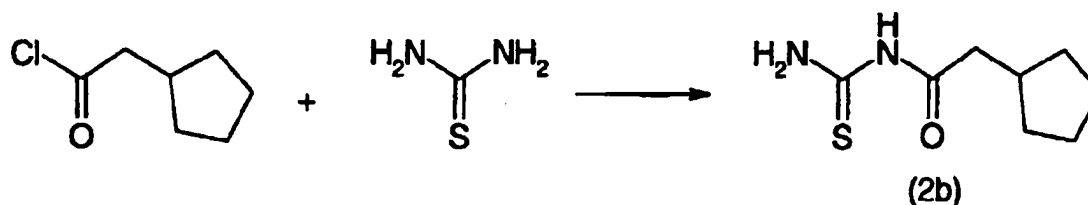
## Herstellung von Thioharnstoffen

## Herstellung von Thioharnstoff 2a



**[0081]** Thioharnstoff (5,0 g, 66 mMol) wurde in Toluol (50 ml) gelöst, und tert-Butylacetylchlorid (8,88 g, 66 mMol) wurde zugegeben. Die Mischung wurde unter Rückfluss für 14 Stunden erhitzt, um eine gelbe Lösung zu ergeben. Die Mischung wurde zur Trockene konzentriert, und der Rest zwischen EtOAc und gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  aufgeteilt. Die gelbe organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und konzentriert, um einen gelben Feststoff zu ergeben. Der Feststoff wurde in einer minimalen Menge EtOAc gelöst und mit Hexan verrieben, um 2a als weißen Feststoff (8,52 g; 75%) zu ergeben. M.S. (Elektrospray): 173 (M-H)<sup>-</sup> 175 (M+H)<sup>+</sup>. Umkehrphasen-HPLC-Homogenität (0,06% TFA;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ ): 99%.

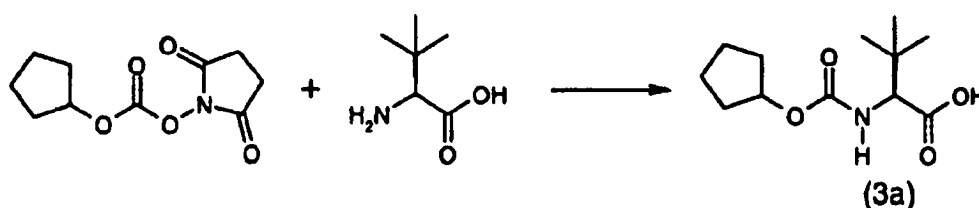
## Herstellung von Thioharnstoff 2b



**[0082]** Unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens und unter Verwendung kommerziell erhältlichen Cyclopentylacetylchlorids anstelle von tert-Butylacetylchlorid ergab sich Thioharnstoff 2b.

## Synthese von Zwischenprodukten 3

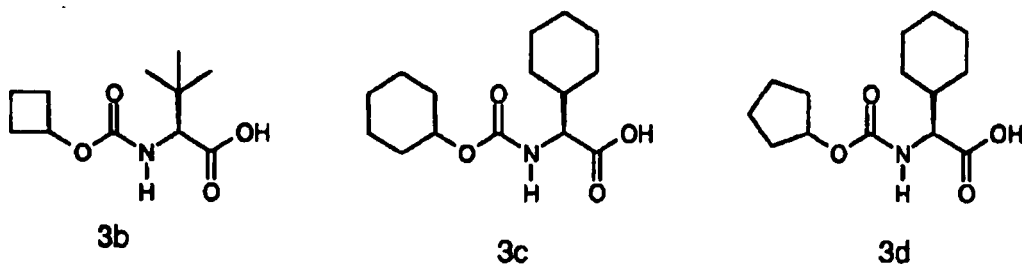
## Herstellung von Carbamat 3a



**[0083]** Tetrahydrofuran (350 ml) wurde in einen Kolben, enthaltend Carbonsäurecyclopentylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester (9,00 g; 39,6 mMol) und tert-Leucin (6,24 g; 47,5 mMol), gegeben, resultierend in einer Suspension. Destilliertes Wasser (100 ml) wurde unter heftigem Rühren zugegeben. Eine kleine Menge des verbliebenen Feststoffs blieb ungelöst. Triethylamin (16,6 ml; 119 mMol) wurde dann zugegeben, resultierend in einer homogenen Lösung, die bei RT gerührt wurde. Nach 2,5 h wurde das THF verdampft und der wässrige Rest mit Wasser verdünnt (100 ml) und die Reaktion durch die Zugabe von 1 N NaOH (26 ml – End-pH-Wert > 10) basisch gemacht. Die Lösung wurde mit EtOAc (2 × 200 ml) gewaschen, und die wässrige Phase wurde dann mit 1 N HCl (ca. 70 ml. – End-pH-Wert < 2) angesäuert. Die trübe Lösung wurde mit EtOAc (200 + 150 ml) extrahiert. Der Extrakt wurde getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und verdampft, um Verbindung 3a als weißen Feststoff (8,68 g) zu ergeben.

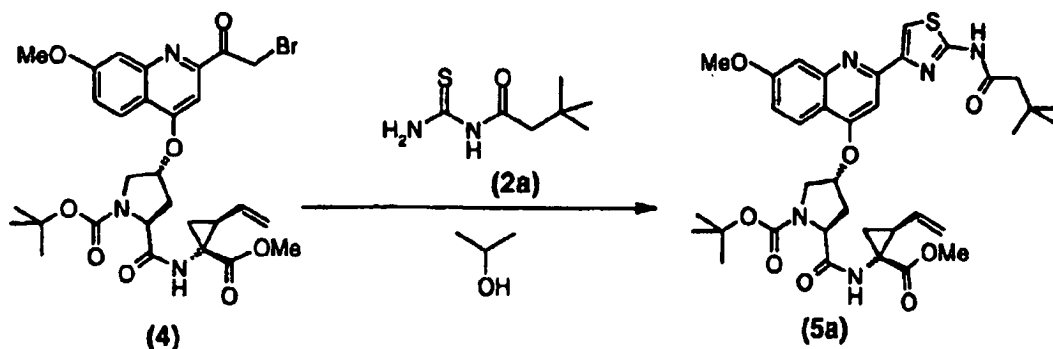
## Herstellung von Carbamaten 3b, 3c und 3d

**[0084]** Unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens und unter Verwendung geeigneter Kombinationen von tert-Butylglycin oder Cyclohexylglycin und Carbonsäurecyclobutyl, Cyclopentyl oder Cyclohexylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester wurden die nachfolgenden Carbamate hergestellt:



Herstellung von Zwischenprodukt 5

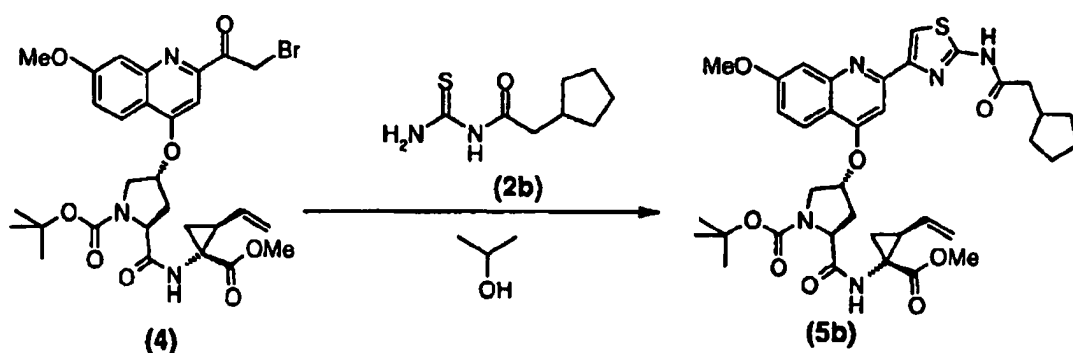
Herstellung von Zwischenprodukt 5a



**[0085]**  $\alpha$ -Bromketon 4 (3,61 g; 5,71 mMol) wurde mit Thioharnstoff 2a (1,09 g; 6,28 mMol) in Isopropanol (140 ml) kombiniert, und die gelbe Lösung für 1,5 h in einem vorgeheizten Ölbad von 70°C platziert. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und zur Trockene abgedampft. Der Rest wurde in EtOAc gelöst. Die EtOAc-Lösung wurde mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  (2x), Wasser (2x) und Salzlauge (1x) gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und verdampft, um das Produkt als orange-braunen Schaum zu ergeben. Flash-Säulenchromatographie in 7:3 Hexan: EtOAc entfernte die weniger polaren Verunreinigungen und 6:4 Hexan: EtOAc ergab reines Produkt als hellgelben Feststoff (3,05 g; 76%). M.S. (Elektrospray): 706,3 (M-H)<sup>-</sup> 708,4 (M+H)<sup>+</sup>. Umkehrphasen-HPLC-Homogenität (0,06% TFA;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ ): 99%.

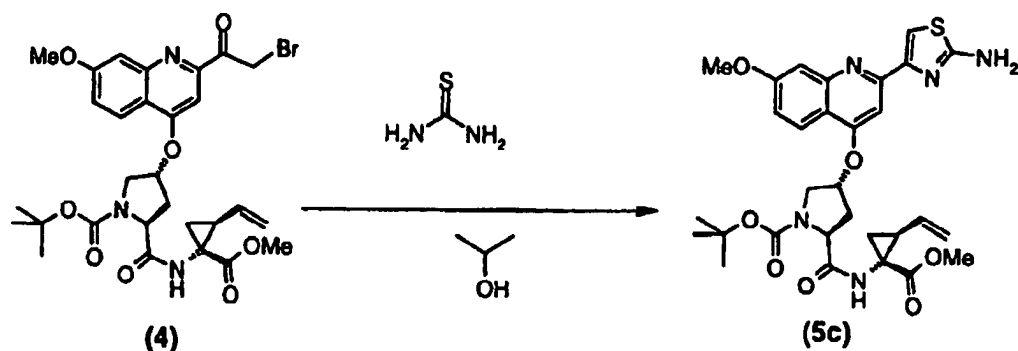
Herstellung von Zwischenprodukt 5b

**[0086]** Unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens und unter Verwendung von Thioharnstoff 2b anstelle von Thioharnstoff 2a wird das entsprechende Zwischenprodukt 5b erhalten:



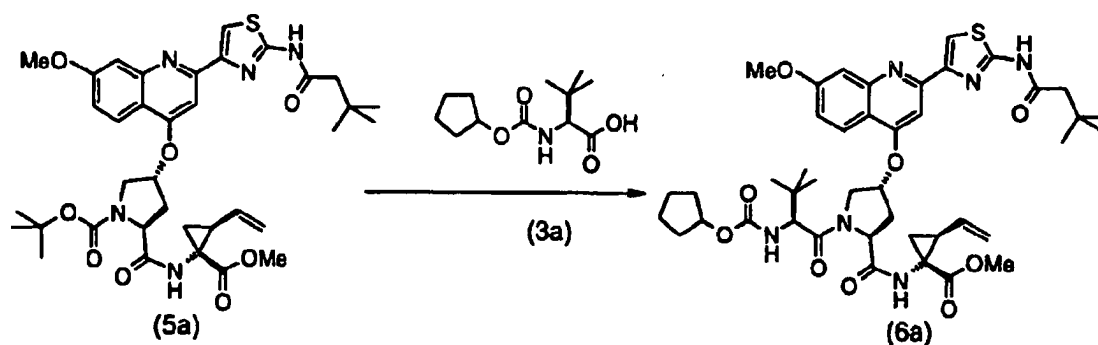
Herstellung von Zwischenprodukt 5c

**[0087]** Unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens und unter Verwendung kommerziell erhältlichen Thioharnstoffs anstelle von Thioharnstoff 2a wird das entsprechende Zwischenprodukt 5c erhalten:



## BEISPIEL 1

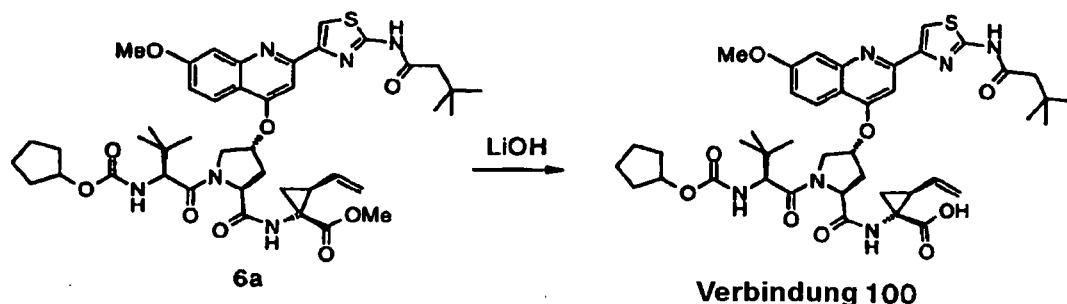
## Synthese von Verbindung 100



## Schritt 1: Herstellung von Zwischenprodukt 6a

**[0088]** Boc-Dipeptid 5a (3,05 g; 4,31 mMol) wurde in 4 N HCl/Dioxan (22 ml) gelöst. Nach Rühren für 30 Minuten bei RT fiel das HCl-Salz aus. MeOH (2 ml) wurde zugegeben, um den Niederschlag zu lösen. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung zur Trockene eingedampft. Das resultierende HCl-Salz wurde in DCM (22 ml) und DIEA (3,0 ml; 17,24 mMol) gelöst; Carbamat 3a (1,15 g; 4,47 mMol) und HATU (1,72 g; 4,516 mMol) wurden zugegeben. Die Lösung wurde für 6 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde dann mit EtOAc verdünnt, und die Lösung mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  (2x), Wasser (2x) und Salzlauge (1x) gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und abgedampft, um Verbindung 6a als gelben Feststoff zu erhalten. Flash-Säulenchromatographie unter Eluierung zuerst mit Hexan:EtOAc 7:3 und dann 6:4 ergab reinen Me-Ester 6a als weißen Schaum (3,25 g; 90%). M.S. (Elektrospray): 831,4 (M-H)<sup>-</sup> 833,4 (M+H)<sup>+</sup> 855,4 (M+Na)<sup>+</sup>. Umkehrphasen-HPLC-Homogenität (0,06% TFA;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ ): 98%.

## Schritt 2: Hydrolyse des Esters



## Verbindung 100

**[0089]** Methylester 6a (3,24 mg; 3,89 mMol) wurde in THF (40 ml) und MeOH (20 ml) gelöst, und eine wässrige Lösung von LiOH (1,63 mg; 38,9 mMol in 25 ml) wurde zugegeben. Die gelbe Reaktionsmischung wurde für 5,5 h gerührt und dann konzentriert, um eine fast weiße Suspension zu liefern. Die Suspension wurde in EtOAc und Salzlauge gelöst und mit deionisiertem Wasser vorbereitet. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde durch Zugabe von 1 N HCl auf 6 eingestellt. Die Schichten wurden getrennt und die wässrige Schicht weiter mit EtOAc (2x) extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Extrakte wurden mit deionisiertem Wasser (2x), mit deionisiertem Wasser vorbereiteter Salzlauge (1x), gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und abgedampft, um

Verbindung 100 als blassgelb-weißen Feststoff (3,02 g; 95% Ausbeute) zu erhalten.

#### Umwandlung zum Na-Salz

**[0090]** Die neutrale Verbindung 100 (1,22 g; 1,49 mMol) wurde in MeOH (30 ml) gelöst und 1 Äquivalent 0,01 N NaOH (14,85 ml) wurde zugegeben – kein Produkt fiel aus. Die klare gelbe Lösung wurde konzentriert, mit deionisiertem Wasser verdünnt, ausgefroren und lyophilisiert, um das Produkt (Na-Salz) als gelb-weißen amorphen Feststoff (1,24 g; 99% Ausbeute) zu erhalten.

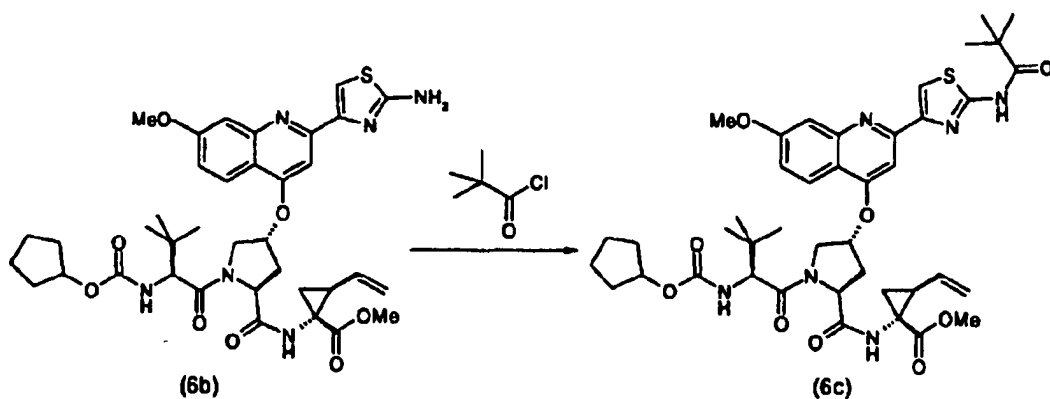
Na-Salz: MW: 840,98;  $C_{42}H_{53}N_6O_9SNa$

M.S. (Elektrospray): 817,3 (M-H)<sup>-</sup> 819,4 (M+H)<sup>+</sup> 841,4 (M+Na)<sup>+</sup>. Umkehrphasen-HPLC-Homogenität (0,06% TFA;  $CH_3CN:H_2O$ ): 98%

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): ca. 6:1 Mischung von Rotameren;  $\delta$  8,11-7,65 (m, 4H), 7,33 (bs, 1H), 7,18-6,97 (m, 2H), 6,36-6,08 (m, 1H), 5,55-5,33 (m, 1H), 4,98 (d, J = 18,0 Hz, 1H), 4,85 (bs, 1H), 4,80 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 4,50-4,41 (m, 1H), 4,22-4,02 (m, 2H), 3,92 (s, 3H), 2,72-2,45 (m, 1H), 2,50 (unter DMSO, s, 2H), 2,40-2,26 (m, 1H), 1,89-1,43 (m, 9H), 1,37-1,30 (m, 1H), 1,30-1,12 (m, 1H), 1,03 & 0,90 (2x s, 9H), 0,98 & 0,94 (2x s, 9H).

#### BEISPIEL 2

##### Synthese von Verbindung 101

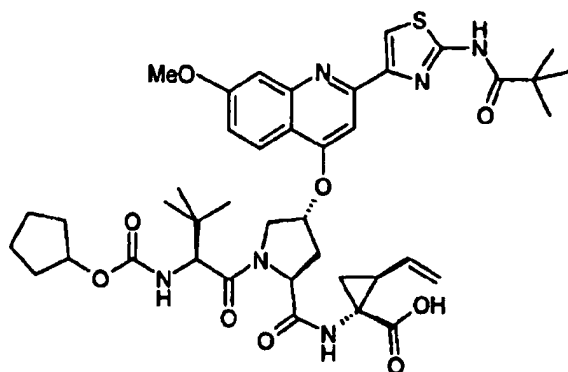


**[0091]** Denselben wie im ersten Schritt von Beispiel 1 beschriebenen Verfahren folgend, wurde unter Verwendung von Boc-Dipeptid 5c anstelle von 5a Verbindung 6b erhalten.

**[0092]** Verbindung 6b (70 mg, 0,095 mMol) wurde in 2 ml DCM gelöst und nacheinander mit DIEA (0,045 ml, 0,26 mMol) und Pivaloylchlorid (0,015 ml, 0,12 mMol) behandelt. Nach Rühren für 1 h bei 40°C wurde zusätzliches Pivaloylchlorid (0,015 ml, 0,12 mMol) zugegeben und das Rühren wurde für zusätzliche 2 h fortgesetzt. Nachdem die Lösung konzentriert war, wurde der Rest in EtOAc gelöst. Die Lösung wurde mit einer gesättigten  $NaHCO_3$ -Lösung und Salzlauge gewaschen, getrocknet ( $MgSO_4$ ) und konzentriert, um 82 mg rohe Verbindung 6c zu erhalten, die ohne Reinigung verwendet wurde.

**[0093]** Das Methylester-Derivat 6c wurde wie in Schritte 2 von Beispiel 1 hydrolysiert und durch präparative HPLC unter Verwendung einer YMC-Combi-Prep.ODS-AQ-Säule, 50 × 20 mm, ID, S-5  $\mu m$ , 120 Å, sowie einem linearen Gradientenprogramm von 2 bis 100% AcCN/Wasser (0,06% TFA) gereinigt.

**[0094]** Die Fraktionen wurden durch analytische HPLC analysiert, und die reinen Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert, ausgefroren und lyophilisiert, um Verbindung 101 als Trifluoracetatsalz zu ergeben:

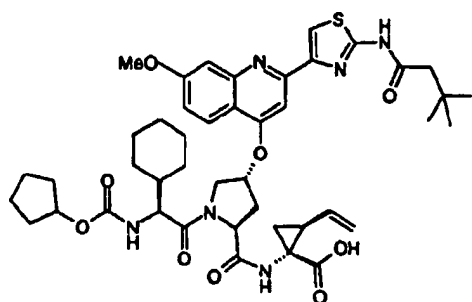
**Verbindung 101**

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): ca. 85:15 Mischung von Rotameren, Hauptisomerenbeschreibung;  $\delta$  8,56 (s, 1H), 8,40-8,22 (m, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 7,67 (bs, 1H), 7,52 (bs, 1H), 7,24-7,15 (m, 1H), 7,03 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 5,78-5,67 (m, 1H), 5,61-5,53 (m, 1H), 5,19 (dd,  $J = 17,2, 1,6$  Hz, 1H), 5,09-5,03 (m, 1H), 4,63-4,55 (m, 1H), 4,49-4,39 (m, 2H), 4,11-3,92 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 2,62-2,53 (m, 1H), 2,33-2,25 (m, 1H), 2,06-1,98 (m, 1H), 1,72-1,25 (m, 10 H), 1,30 (s, 9H), 0,97 (s, 9H).

M.S. (Electrospray): 803,3 ( $\text{M-H}^-$ ) 805,3 ( $\text{M+H}^+$ ). Umkehrphasen-HPLC Homogenität (0,06 % TFA;  $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ ): 97%

**BEISPIEL 3****Herstellung von Verbindung 102**

**[0095]** Dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren folgend und unter Verwendung von Carbamat 3d anstelle von 3a und unter Verwendung von präparativer HPLC, um die endgültige Verbindung, wie in Beispiel 2 beschrieben, zu reinigen, wurde Verbindung 102 als das Trifluoracetatsalz erhalten:

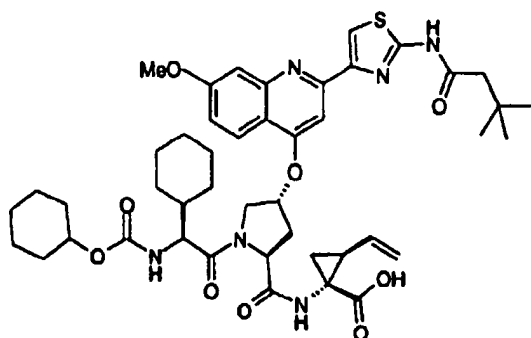
**Verbindung 102**

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): ca. 90:10 Mischung von Rotameren, Hauptisomerenbeschreibung;  $\delta$  12,37 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,40-8,06 (m, 2H), 7,67-7,40 (m, 2H), 7,26 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,26-7,13 (m, 1H), 5,77-5,65 (m, 1H), 5,62-5,49 (m, 1H), 5,23-5,16 (m, 1H), 5,10-5,03 (m, 1H), 4,57-4,37 (m, 3H), 4,03-3,88 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 2,64-2,54 (m, 1H), 2,41 (s, 2H), 2,37-2,22 (m, 1H), 2,04-1,95 (m, 1H), 1,79-1,21 (m, 16H), 1,17-0,85 (m, 5H), 1,04 (s, 9H).

M.S. (Electrospray): 843,5 ( $\text{M-H}^-$ ) 845,4 ( $\text{M+H}^+$ ). Umkehrphasen-HPLC Homogenität (0,06 % TFA;  $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ ): 99%

## BEISPIEL 4

## Herstellung von Verbindung 103



Verbindung 103

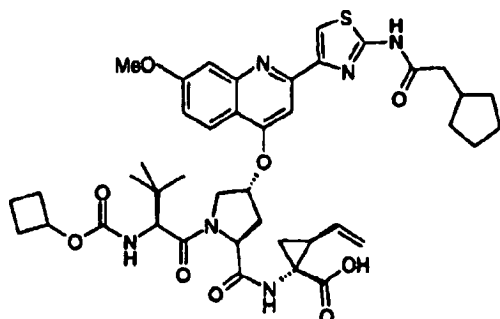
[0096] Dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren folgend und unter Verwendung von Carbamat 3c anstelle von 3a und unter Verwendung von präparativer HPLC, um die endgültige Verbindung, wie in Beispiel 2 beschrieben, zu reinigen, wurde Verbindung 103 als das Trifluoracetatsalz erhalten:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): ca. 85:15 Mischung von Rotameren, Hauptisomerenbeschreibung; δ 12,35 (s, 1H), 8,52 (m, 1H), 8,43-8,06 (m, 2H), 7,67-7,41 (m, 2H), 7,26 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,24-7,11 (m, 1H), 5,77-5,65 (m, 1H), 5,62-5,48 (m, 1H), 5,23-5,15 (m, 1H), 5,10-5,03 (m, 1H), 4,52-4,38 (m, 2H), 4,15-4,05 (m, 1H), 4,03-3,89 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 2,63-2,52 (m, 1H), 2,41 (s, 2H), 2,35-2,23 (m, 1H), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,81-1,41 (m, 11H), 1,38-0,86 (m, 12H), 1,04 (s, 9H).

M.S. (Elektrospray): 857,5 (M-H)<sup>-</sup> 859,4 (M+H)<sup>+</sup>, Umkehrphasen-HPLC Homogenität (0,06 % TFA; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O): 99%

## BEISPIEL 5

## Herstellung von Verbindung 104



Verbindung 104

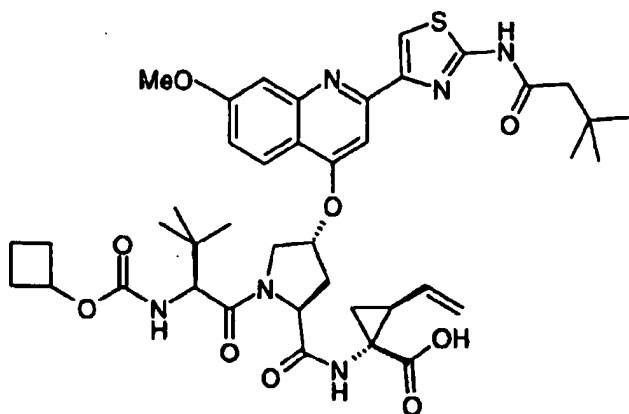
[0097] Dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren folgend, aber unter Verwendung von Carbamat 3b anstelle von 3a und Boc-Dipeptid 5b anstelle von 5a, und unter Verwendung von präparativer HPLC, um die endgültige Verbindung, wie in Beispiel 2 beschrieben, zu reinigen, wurde Verbindung 104 als das Trifluoracetatsalz erhalten:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): ca. 3:1 Mischung von Rotameren; δ 8,02 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,84 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,33 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,14 (dd, J = 2,5, 8,2 Hz, 1H), 7,09 (dd, J = 2,2, 9,2 Hz, 1H), 6,29-6,08 (m, 1H), 5,54-5,32 (m, 1H), 4,99 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 4,80 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 4,76-4,64 (m, 1H), 4,46 (dd, J = 6,7, 13,9 Hz, 1H), 4,19-4,08 (m, 3H), 3,92 (s, 3H), 2,70-2,61 (m, 2H), 2,37-2,09 (m, 4H), 2,03-1,82 (m, 1H), 1,85 (bs, 2H), 1,77-1,44 (m, 8H), 1,35-1,29 (m, 1H), 1,29-1,15 (m, 4H), 0,98 & 0,90 (2x s, 9H).

M.S. (Electrospray): 815,3 (M-H)<sup>-</sup> 817,3 (M+H)<sup>+</sup>, Umkehrphasen-HPLC Homogenität (0,06% TFA; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O): 98%

## BEISPIEL 6

## Herstellung von Verbindung 105



Verbindung 105

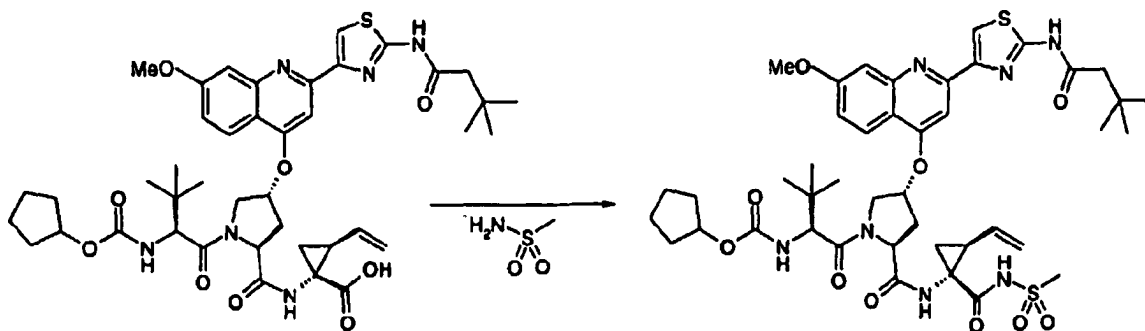
**[0098]** Dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren folgend, aber unter Verwendung von Carbamat 3b anstelle von 3a und unter Verwendung von präparativer HPLC, um die endgültige Verbindung, wie in Beispiel 2 beschrieben, zu reinigen, wurde Verbindung 105 als das Trifluoracetatsalz erhalten:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): ca. 7:1 Mischung von Rotameren;  $\delta$  8,58 (s, 1H), 8,19 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,76-7,50 (m, 2H), 7,35-7,20 (m, 1H), 7,19 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,78-5,67 (m, 1H), 5,65-5,50 (m, 1H), 5,19 (d,  $J = 17,0$  Hz, 1H), 5,07 (d,  $J = 10,2$  Hz, 1H), 4,51-4,42 (m, 2H), 4,42-4,31 (m, 1H), 4,02 (d,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 4,02-3,93 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 2,63-2,52 (m, 1H), 2,42 (s, 2H), 2,35-2,25 (m, 1H), 2,07-1,95 (m, 3H), 1,90-1,76 (m, 1H), 1,70-1,41 (m, 3H), 1,30-1,23 (m, 1H), 1,04 (s, 9H), 0,96 & 0,87 (2xs, 9H).

M.S. (Elektrospray): 803,4 ( $\text{M-H}^-$ ) 805,4 ( $\text{M+H}^+$ ), Umkehrphasen-HPLC Homogenität (0,06 % TFA;  $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ ): 98%.

## BEISPIEL 7

## Herstellung von Verbindung 106



Verbindung 106

**[0099]** Verbindung 100 von Beispiel 1 (29,8 mg, 0,036 mMol) wurde mit HATU (1,2 Äq., 19,7 mg, 0,052 mMol) kombiniert und in wasserfreiem DMF (4 ml) gelöst. Die Lösung wurde bei RT gerührt und DIPEA (5 Äq., 31,4  $\mu\text{l}$ , 0,18 mMol) wurde tropfenweise über ca. 1 Minute zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten gerührt und durch analytische HPLC auf die Bildung des aktivierten Esters analysiert. Eine Lösung von Methansulfonamid (5,8 Äq., 19,7 mg, 0,207 mMol), DMAP (5,4 Äq., 23,5 mg, 0,193 mMol) und DBU (4,8 Äq., 25,8  $\mu\text{l}$ , 0,172 mMol) wurde in DMF (1 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT 16 h gerührt, bevor sie im Vakuum konzentriert wurde. Der Rest wurde in DMSO aufgenommen und durch präparative HPLC gereinigt. Die Lyophilisierung ergab das Endprodukt (23 mg, 71,3%) als gebrochen-weißen amorphen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  12,35 (s, 1H), 10,53 (s, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,40-8,20 (m, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,61 (bs, 1H), 7,51 (bs, 1H), 5,67-5,55 (m, 2H), 5,23-5,18 (m, 1H), 5,10 (d,  $J = 12$  Hz, 1H), 4,68-4,57 (m, 1H), 4,50 (bd,  $J = 12$  Hz, 1H), 4,46-4,37 (m, 1H), 4,07 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,17 (s, 3H), 2,78-2,58 (m, 1H), 2,42 (s, 2H), 2,29-2,19 (m, 1H), 2,19-2,09 (m, 1H), 1,71 (dd,  $J = 7,8, 7,6$  Hz, 1H), 1,67-1,55

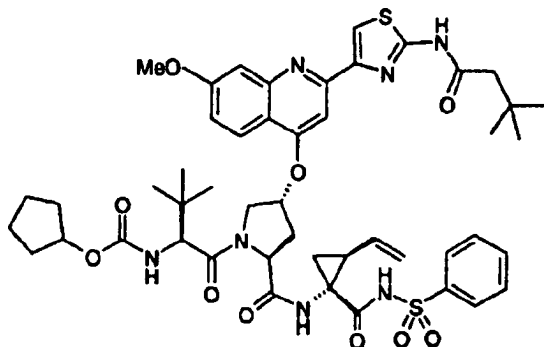
(m, 4H), 1,55-1,37 (m, 4H), 1,04 (s, 9H), 0,98 (s, 9H), 0,97-0,87 (m, 2H).

M.S. (Eelectrospray): 896,5 (M+H)<sup>+</sup> und 894,5 (M-H)<sup>-</sup>.

RP-HPLC: Rt = 6,7 Minuten (Homogenität = 100%).

## BEISPIEL 8

### Herstellung von Verbindung 107



**Verbindung 107**

**[0100]** Die Verwendung des in Beispiel 7 beschriebenen Verfahrens und unter Verwendung von Benzolsulfonamid anstelle von Methylsulfonamid ergab Verbindung 107 als blassgelben amorphen Feststoff in 54%iger Ausbeute.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12,39 (s, 1H), 10,89 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,40-8,22 (m, 1H), 8,18 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,67-7,63 (m, 1H), 7,63-7,54 (m, 3H), 7,54-7,45 (m, 1H), 7,30-7,15 (m, 1H), 7,10 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 5,62-5,51 (m, 1H), 5,38-5,26 (m, 1H), 5,16-5,08 (m, 1H), 4,93 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 4,70-4,58 (m, 1H), 4,57-4,49 (m, 1H), 4,48-4,39 (m, 1H), 4,09 (d, J = 7, 8 Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,69-2,59 (m, 1H), 2,41 (s, 2H), 2,28-2,16 (m, 1H), 2,14-2,04 (m, 1H), 1,72-1,52 (m, 4H), 1,51-1,37 (m, 4H), 1,29-1,22 (m, 1H), 1,03 (s, 9H), 1,00 (s, 9H), 0,99-0,92 (m, 1H).

M.S. (Electrospray): 958,5 (M+H)<sup>+</sup>, und 956,5 (M-H)<sup>-</sup>.

RP-HPLC: Rt = 7,2 Minuten (Homogenität = 95%).

## BEISPIEL 9

### NS 3-NS4A-Protease-Test

**[0101]** Der enzymatische Test, der verwendet wurde, um die vorliegende Verbindung zu beurteilen, ist in der WO 00/09543 und der WO 00/59929 beschrieben.

## BEISPIEL 10

### Zellbasierter HCV-RNA-Replikationstest

#### Zellkultur

**[0102]** Huh7-Zellen, die ein subgenomisches HCV-Replikon stabil aufrechterhalten, wurden wie zuvor beschrieben (Lokiman et al., 1999, Science 285: 110-113) gebildet und als 522.3-Zelllinie bezeichnet. 522.3-Zellen werden in Dulbecco's modifiziertem Earle-Medium (DMEM), ergänzt mit 10% FBS, und 1 mg/ml Neomycin (Standardmedium), gehalten. Während des Tests wurde DMEM-Medium, ergänzt mit 10% FBS, enthaltend 0,5% DMSO, und ohne Neomycin verwendet (Testmedium). 16 h vor der Verbindungszugabe werden die 522.3-Zellen trypsinisiert und auf 50.000 Zellen/ml im Standardmedium verdünnt. 200 µl (10.000 Zellen) werden in jede Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen verteilt. Die Platte wurde dann mit 5% CO<sub>2</sub> bis zum nächsten Tag bei 37°C inkubiert.

## Reagentien und Materialien:

Produkt	Firma	Katalog-Nr.	Lagerung
DMEM	Wisent Inc.	10013CV	4°C
DMEM	Sigma	D-2650	RT
Dulbecco's PBS	Gibco-BRL	14190-136	RT
Fötales Rinderserum	Bio-Whittaker	14-901F	-20°C/4°C
Neomycin (G418)	Gibco-BRL	10131-027	-20°C/4°C
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL	25300-054	-20°C/4°C
Platten mit 96 Vertiefungen	Costar	3997	RT
PVDF-0,22 µm Filtereinheit	Millipore	SLGV025LS	RT
Deep-Well-Polypropylen-titerplatte	Beckman	267007	RT

## Herstellung der Testverbindung

**[0103]** 10 µl der Testverbindung (in 100% DMSO) wurden zu 2 ml Testmedium für eine endgültige DMSO-Konzentration von 0,5% zugegeben, und die Lösung wurde für 15 Minuten mit Ultraschall behandelt und durch eine 0,22 µm-Millipore-Filter-Einheit filtriert. 900 µl wurden in Reihe A einer Deep-Well-Polypropylen-Titerplatte transferiert. Die Reihen B bis H enthalten 400 µl Aliquote des Testmediums (enthaltend 0,5% DMSO) und werden verwendet, um serielle Verdünnungen (1/2) herzustellen durch Transferieren von 400 µl von Reihe zu Reihe (in Reihe H war keine Verbindung enthalten).

## Anwendung von Testverbindung auf die Zellen

**[0104]** Zellkulturmedium ließ man aus der Platte mit 96 Vertiefungen, enthaltend die S22.3-Zellen, ansaugen. 175 µl Testmedium mit der geeigneten Verdünnung an Testverbindung wurde von jeder Vertiefung der Verbindungsplatte zur entsprechenden Vertiefung der Zellkulturplatte transferiert (Reihe H wurde als die "Nicht-Inhibierungskontrolle" verwendet). Die Zellkulturplatte wurde mit 5% CO<sub>2</sub> für 72 h bei 37°C inkubiert.

## Extraktion von gesamt-zellulärer RNA

**[0105]** Nach der 72 h-Inkubationsdauer wurde die gesamt-zelluläre RNA aus den S22.3-Zellen der Platte mit 96 Vertiefungen unter Verwendung des RNeasy-96-Kits (Qiagen®, RNeasy Handbook, 1999) extrahiert. Kurz gesagt wurde das Testmedium vollständig aus den Zellen entfernt und 100 µl RLT-Puffer (Qiagen®), enthaltend 143 mM β-Mercaptoethanol, wurde zu jeder Vertiefung der Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen zugegeben. Die Mikroplatte wurde vorsichtig für 20 Sekunden geschüttelt. 100 µl 70% Ethanol wurden dann zu jeder Mikroplattenvertiefung zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Das Lysat wurde entfernt und auf die Vertiefungen einer RNeasy-96-(Qiagen®)-Platte gegeben, die oben auf einem Qiagen®-Square-Well-Block gelegt wurde. Die RNeasy-96-Platte wurde mit einem Band abgedichtet, und der Square-Well-Block mit der RNeasy-96-Platte wurde in den Halter gegeben und in einem Drehzylinder einer 4K15C-Zentrifuge untergebracht. Die Probe wurde bei 6.000 UpM (~5600 × g) bei Raumtemperatur 4 Minuten zentrifugiert. Das Band wurde von der Platte entfernt und 0,8 ml Puffer RW1 (Qiagen® RNeasy 96-Kit) wurde zu jeder Vertiefung der RNeasy-96-Platte zugegeben. Die RNeasy-96-Platte wurde mit einem neuen Stück Band abgedichtet und bei 6.000 UpM bei Raumtemperatur für 4 Minuten zentrifugiert. Die RNeasy-96-Platte wurde oben auf einen weiteren sauberen Square-Well-Block gelegt, das Band entfernt, und 0,8 ml Puffer RPE (Qiagen® RNeasy 96-Kit) wurde zu jeder Vertiefung der RNeasy-96-Platte zugegeben. Die RNeasy-96-Platte wurde mit einem neuen Stück Band abgedichtet und bei 6.000 UpM bei Raumtemperatur für 4 Minuten zentrifugiert. Das Band wurde entfernt und weitere 0,8 ml Puffer RPE (Qiagen® RNeasy 96-Kit) wurde zu jeder Vertiefung der RNeasy-96-Platte zugegeben. Die RNeasy-96-Platte wurde mit einem neuen Stück Band abgedichtet und bei 6.000 UpM bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Das Band wurde entfernt, die RNeasy-96-Platte wurde oben auf ein Gestell, enthaltend 1,2 ml Sammel-Mikroröhrchen gelegt. Die RNA wurde durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser zu jeder Vertiefung eluiert, wobei die Platte mit einem neuen Stück Band abgedichtet wurde, und bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert wurde. Die Platte wurde dann bei 6.000 UpM bei Raumtemperatur

für 4 Minuten zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde mit einem zweiten Volumen 50 µl RNase-freiem Wasser wiederholt. Die Mikroröhrchen mit gesamt-zellulärer RNA wurden bei -70°C gelagert.

#### Quantifizierung der gesamt-zellulären RNA

**[0106]** Die RNA wurde auf dem STORM®-System (Molecular Dynamics®) unter Verwendung des RiboGreen®-RNA-Quantifizierungskits (Molecular Probes®) quantifiziert. Kurz gesagt wurde das RiboGreen-Reagens in TE 200-fach verdünnt (10 mM Tris-HCl pH = 7,5, 1 mM EDTA). Allgemein wurden 50 µl Reagens in 10 ml TE verdünnt. Eine Standardkurve aus ribosomaler RNA wurde mit TE auf 2 µg/ml verdünnt und vorbestimmte Mengen (100, 50, 40, 20, 10, 5, 2 und 0 µl) der ribosomalen RNA-Lösung wurden dann in eine neue Platte mit 96 Vertiefungen (COSTAR # 3997) transferiert und das Volumen auf 100 µl mit TE komplettiert. Allgemein wurde Säule 1 der Platte mit 96 Vertiefungen für die Standardkurve verwendet, und die anderen Vertiefungen wurden für die zu quantifizierenden RNA-Proben verwendet. 10 µl jeder RNA-Probe, die zu quantifizieren war, wurden in die entsprechende Vertiefung der Platte mit 96 Vertiefungen transferiert, und 90 µl TE wurden zugegeben. Ein Volumen (100 µl) verdünnten RiboGreen-Reagenses wurde zu jeder Vertiefung der Platte mit 96 Vertiefungen zugegeben und für 2 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und vor Licht geschützt (eine 10 µl-RNA-Probe in einem 200 µl-Endvolumen erzeugt eine 20-fache Verdünnung). Die Fluoreszenz-Intensität jeder Vertiefung wurde auf dem STORM®-System (Molecular Dynamics®) gemessen. Eine Standardkurve wurde auf Basis der bekannten Mengen der ribosomalen RNA und der resultierenden Fluoreszenz-Intensitäten erstellt.

**[0107]** Die RNA-Konzentration in den experimentellen Proben wurde aus der Standardkurve bestimmt und für die 20-fache Verdünnung korrigiert.

**[0108]** Reagentien und Materialien:

Produkt	Firma	Katalog-Nr.	Lagerung
DEPC	Sigma	D5758	4°C
EDTA	Sigma	E5134	RT
Trizma-Base	Sigma	T8524	RT
Trizma-HCl	Sigma	T7149	RT
Sammelröhrchen-Streifen (Collection Tube Stripes)	Qiagen	19562	RT
Ribogreen-RNA-Quantifizierungskit	Molecular Probe	R11490	-20°C
Rneasy 96-Kit	Qiagen	74183	RT
Square-Well-Blocks	Qiagen	19573	RT

#### Echtzeit-RT-PCR

**[0109]** Die Echtzeit-RT-PCR wurde auf dem ABI-Prism 7700 Sequence Detection System unter Verwendung des TaqMan EZ RT-PCR-Kits von (Perkin-Elmer Applied Biosystems®) durchgeführt. RT-PCR wurde für die Quantifizierung des 5'-IRES von HCV-RNA unter Verwendung der Taqman-Technologie (Roche Molecular Diagnostics Systems) ähnlich zur vorbeschriebenen Technik (Martell et al., 1999, J. Clin. Microbiol. 37: 327-332) optimiert. Das System wertet die 5'-3'-nucleolytische Aktivität von AmpliTaq-DNA-Polymerase aus. Kurz gesagt verwendet das Verfahren eine zweifach markierte fluorogene Hybridisierungssonde (PUTR-Sonde), die speziell an das Template zwischen den PCR-Primern (Primer 8125 und 7028) anhaftet. Das 5'-Ende der Sonde enthält einen Fluoreszenz-Reporter (6-Carboxyfluorescein [FAM]) und das 3'-Ende enthält einen Fluoreszenz-Quencher (6-Carboxytetramethylrhodamin [TAMRA]). Das Spektrum der FAM-Reporteremission wurde durch den Quencher auf der intakten Hybridisierungssonde unterdrückt. Eine Nucleasedegradation der Hybridisierungssonde setzt den Reporter frei, resultierend in einer Zunahme der Fluoreszenzemission. Der ABI Prism 7700-Sequenzdetektor misst kontinuierlich die Zunahme der Fluoreszenzemission während der PCR-Amplifikation, derart dass das amplifizierte Produkt direkt proportional zum Signal war. Der Amplifikationsausdruck wurde früh in der Reaktion an dem Punkt analysiert, der die logarithmische Phase der Produktakkumulation darstellt. Der Punkt, der die definierte Detektionsgrenze der Zunahme des Fluoreszenzsignals im Zusammenhang mit dem exponentiellen Anwachsen des PCR-Produkts für den Sequenzdetektor darstellt,

wurde als die Zyklusgrenze ( $C_T$ ) definiert. Die  $C_T$ -Werte sind umgekehrt proportional zur Menge an Eingangs-HCV-RNA; so dass unter identischen PCR-Bedingungen die Ausgangskonzentration von HCV-RNA umso größer wird, je kleiner der  $C_T$  ist. Eine Standardkurve wurde automatisch durch das ABI Prism 7700-Detektionssystem erstellt, indem der  $C_T$  gegen jede Standardverdünnung bekannter HCV-RNA-Konzentration aufgetragen wird.

**[0110]** Referenzproben für die Standardkurve sind auf jeder RT-PCR-Platte enthalten. Die HCV-Replikon-RNA wurde in vitro (durch T7-Transkription) synthetisiert, gereinigt und durch  $OD_{260}$  quantifiziert. Unter Berücksichtigung, dass  $1 \mu\text{g}$  dieser RNA =  $2,15 \times 10^{11}$  RNA-Kopien darstellt, werden Verdünnungen hergestellt, um  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  oder  $10^2$  genomische RNA-Kopien/ $5 \mu\text{l}$  zu haben. Die gesamt-zelluläre Huh-7-RNA wurde ebenfalls mit jeder Verdünnung ( $50 \text{ ng}/50 \mu\text{l}$ ) einbezogen.  $5 \mu\text{l}$  jedes Referenzstandards (HCV-Replikon + Huh-7-RNA) wurden mit  $45 \mu\text{l}$  Reagenzmischung kombiniert und in der Echtzeit-RT-PCR-Reaktion verwendet.

**[0111]** Die Echtzeit-RT-PCR-Reaktion wurde für die experimentellen Proben eingerichtet, die auf den RNeasy-96-Vertiefungsplatten gereinigt wurden, indem  $5 \mu\text{l}$  jeder gesamt-zellulären RNA-Probe mit  $45 \mu\text{l}$  von Reagenzmischung kombiniert wurden.

#### Reagentien und Materialien:

Produkt	Firma	Katalog-Nr.	Lagerung
TaqMan EZ RT-PCR-Kit	PE Applied Biosystems	N808-0236	-20°C
MicroAmp Optical Caps	PE Applied Biosystems	N801-0935	RT
MicroAmp Optical 96-Well-Reaktionsplatte	PE Applied Biosystems	N801-0560	RT

#### Reagens-Mischzubereitung:

Komponente	Volumen für eine Probe ( $\mu\text{l}$ )	Volumen für eine Platte ( $\mu\text{l}$ )(91 Proben + Totvolumen)	Endkonzentration
Rnase-freies Wasser	16,5	1617	
5X TaqMan EZ-Puffer	10	980	1X
Mn(OAc) <sub>2</sub> (25 mM)	6	588	3 mM
dATP (10 mM)	1,5	147	300 $\mu\text{M}$
dCTP (10 mM)	1,5	147	300 $\mu\text{M}$
dGTP (10 mM)	1,5	147	300 $\mu\text{M}$
dUTP (20 mM)	1,5	147	600 $\mu\text{M}$
Vorwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	1	98	200 nM
Rückwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	1	98	200 nM
PUTR-Sonde (5 $\mu\text{M}$ )	2	196	200 nM
rTth DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{l}$ )	2	196	0,1 U/ $\mu\text{l}$
AmpErase UNG (1 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	49	0,01 U/ $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	45	4410	

Vorwärts-Primer-Sequenz (SEQ ID 1): 5'- ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT AGT -3'

Umkehr-Primer-Sequenz (SEQ ID Nr. 2): 5'- TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG -3'

Nebenbemerkung: Diese Primer amplifizieren eine Region von 256-nt, die in der 5'- untranslatierten Region von HCV vorliegt.

**PUTR-Sondensequenz (SEQ ID Nr. 3):** 6FAM-TGG TCT GCG GAA CCG GTG

AGT ACA CC - TAMRA

**[0112]** Keine Template-Kontrollen (no template controls) (NTC): Auf jeder Platte werden 4 Vertiefungen als "NTC" verwendet. Für diese Kontrollen werden 5 µl Wasser anstelle von RNA zu der Vertiefung zugegeben.

Thermische Zyklusbedingungen:

50°C 2 min

60°C 30 min

90°C 5 min

95°C 15s  
60°C 1 min } für 2 Zyklen

90°C 15s  
60°C 1 min } für 40 Zyklen

**[0113]** Nach der Beendigung der RT-PCR-Reaktion erfordert die Datenanalyse das Einstellen des Grenz-Fluoreszenzsignals für die PCR-Platte, und eine Standardkurve wurde aufgestellt, indem der Ct-Wert gegen die RNA-Kopienanzahl, die in jeder Referenzreaktion verwendet wurde, aufgetragen wurde. Die für die Testproben erhaltenen Ct-Werte werden verwendet, um eine RNA-Kopienanzahl, basierend auf der Standardkurve, zu interpolieren.

**[0114]** Schließlich wurde die RNA-Kopienanzahl normalisiert (basierend auf der RiboGreen RNA-Quantifizierung der gesamt-RNA, extrahiert aus der Zellkulturvertiefung) und als Genom-Äquivalente/µg an gesamt-RNA [ge/µg] ausgedrückt.

**[0115]** Die RNA-Kopienanzahl [g.e./µg] aus jeder Vertiefung der Zellkulturplatte war ein Maß der Menge an replizierter HCV-RNA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Inhibitor. Die %-Inhibierung wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

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

**[0116]** Eine nicht-lineare Ausgleichskurve nach dem Hill-Modell wurde auf die Inhibitionskonzentrationsdaten angewandt, und die 50% wirksame Konzentration ( $EC_{50}$ ) wurde durch Verwendung einer SAS-Software (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.) berechnet.

**[0117]** Wenn die Verbindungen dieser Erfindung in den vorangehenden enzymatischen und zellbasierten Tests beurteilt wurden, wurden die Verbindungen als hochgradig aktiv festgestellt. Noch spezieller hatten die Verbindungen  $IC_{50}$  unter 0,1 µM im NS3-NS4A-Proteasetest und  $EC_{50}$  unter 0,5 µM im HCV-RNA-Replikationstest auf Zellbasis.

## BEISPIEL 11

### Spezifizitätstests

**[0118]** Die verwendeten Spezifizitätstests, um die Selektivität dieser Verbindung zu beurteilen, werden in der WO 00/09543 beschrieben.

**[0119]** Wenn die Verbindungen in den Spezifizitätstests beurteilt wurden, wurde von den Verbindungen der Formel 1 gefunden, dass sie dahingehend selektiv sind, dass sie keine signifikante Inhibierung in Human-Leukozyt-Elastase- und Cathepsin B-Tests zeigen.

## Pharmakokinetische Eigenschaften

**[0120]** Die vorliegenden Verbindungen zeigen ebenfalls gute pharmakokinetische Eigenschaften, wie detektierbare Plasma-Niveaus in der Ratte bei 1 Stunde und 2 h nach oraler Dosis von 4 oder 5 mg/kg.

**[0121]** Noch expliziter wurde der nachfolgende Test, ein orales in vivo-Absorptions-Screening, verwendet, um Plasmaspiegel von Testverbindungen in einer Ratte nach oraler Verabreichung zu bestimmen:

## Materialien und Verfahren:

## 1. Verfahren, verwendet, um die Verbindungen zusammen zu fassen ("Kassettenselektion"):

**[0122]** Die Selektion von Verbindungen, um diese in einer "Kassette" zusammen zu fassen, basierte auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit und den physikochemischen Eigenschaften. Ein Festphasen-Extraktionsverfahren, anwendbar auf sämtliche der ausgewählten Verbindungen, wurde erstellt. Basierend auf dem anfänglichen Testen, wo jede Verbindung im Ratten-Plasma gespiked wurde, und durch HPLC oder HPLC/MS bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  laufen gelassen wurde, wurden die Retentionszeit, Innenmasse und die mögliche Abtrennung der Verbindungen durch HPLC und/oder HPLC/MS als Basis zum Sammeln von 3 bis 4 Verbindungen in einer "Kassette" verwendet.

## 2. Orales Vehikel und Verbindungsherstellung:

**[0123]** Jede "Kassette" enthält 3 bis 4 Verbindungen mit 5 oder 4 mg/kg für jede Verbindung. Die Kassetten wurden als eine orale Suspension in 0,5%iger wässriger Methylcellulose und 0,3%igem Polyoxyethylen(20)sorbitonmonooleat (Tween-80) hergestellt. Das Dosierungsvolumen war 10 ml/kg über orale Sondenernährung.

## 3. Dosierung und Plasma-Probennahme:

**[0124]** Männliche Sprague-Dawley-Ratten ließ man über Nacht in Einzelkäfigen hungern mit Zugang zu wässriger 10%iger Dextrose. Zwei Ratten wurden mit jeder "Kassette" dosiert. Plasmaproben (~1 ml) wurden bei 1 und 2 h nach Dosierung der zwei Ratten gesammelt und zur Extraktion und Analyse vereinigt.

## 4. Verbindungsextraktion und Analyse:

**[0125]** Von jeder Kassette wurden Plasmaproben bei 1 und 2 h, Blind-Plasma, Blind-Plasma, gespiked mit sämtlichen Verbindungen, jeweils bei 0,5  $\mu\text{M}$ , durch das Festphasen-Extraktionsverfahren extrahiert. Die Proben wurden durch HPLC und HPLC/MS zu Vergleichszwecken analysiert. Die Plasmakonzentrationen werden basierend auf der Einzelkonzentration des 0,5  $\mu\text{M}$ -Standards abgeschätzt.

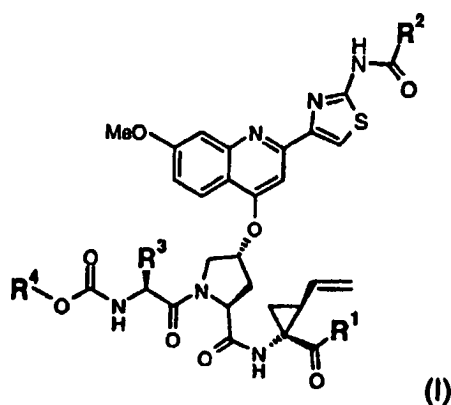
## Ergebnisse

**[0126]** Wenn die Verbindungen der Beispiele 1 bis 8 dieser Erfindung im vorangehenden Screening getestet wurden, wurde gefunden, dass diese in signifikanten Spiegeln im Plasma bei 1-Stunden- und 2-Stunden-Intervallen nach oraler Verabreichung vorliegen mit durchschnittlichen Blutplasmaspiegeln von jeweils 0,83  $\mu\text{M}$  bzw. 0,75  $\mu\text{M}$ .

**[0127]** Diese Demonstration der oralen in vivo-Absorption der Tripeptidverbindungen dieser Erfindung ist bemerkenswert im Hinblick auf die geringe orale Absorption, die dieser Klasse von Peptiden allgemein zugeschrieben wird. Die einfache orale Absorption macht die Verbindungen zur Behandlung der HCV-Infektion verwendbar.

## Patentansprüche

## 1. Verbindung der Formel (I):



worin  $R^1$  Hydroxy oder  $\text{NHSO}_2R^{1A}$  darstellt, worin  $R^{1A}$   $(C_{1-8})$ -Alkyl,  $(C_{3-7})$ -Cycloalkyl oder  $\{(C_{1-6})$ -Alkyl- $(C_{3-7})$ -cycloalkyl $\}$  darstellt, welche alle gegebenenfalls 1 bis 3mal mit Halogen, Cyano, Nitro, O- $(C_{1-6})$ -Alkyl, Amido, Amino oder Phenyl substituiert sind, oder  $R^{1A}$  C6- oder C<sub>10</sub>-Aryl darstellt, welches gegebenenfalls 1 bis 3mal mit Halogen, Cyano, Nitro,  $(C_{1-6})$ -Alkyl, O- $(C_{1-6})$ -Alkyl, Amido, Amino oder Phenyl substituiert ist;  $R^2$  t-Butyl,  $-\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  oder  $-\text{CH}_2$ -cyclopentyl darstellt;  $R^3$  t-Butyl oder Cyclohexyl darstellt, und  $R^4$  Cyclobutyl, Cyclopentyl oder Cyclohexyl darstellt; oder ein pharmazeutisch akzeptables bzw. annehmbares Salz davon.

2. Verbindung der Formel I nach Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $\text{NHSO}_2\text{Me}$ ,  $\text{NHSO}_2$ -cyclopropyl oder  $\text{NHSO}_2\text{Ph}$  darstellt.

3. Verbindung der Formel I nach Anspruch 2, worin  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Me}$  oder Hydroxy darstellt.

4. Verbindung der Formel I nach Anspruch 3, worin  $R^1$  Hydroxy darstellt.

5. Verbindung der Formel I nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, worin  $R^2$  t-Butyl oder  $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  darstellt.

6. Verbindung der Formel I nach Anspruch 5, worin  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  darstellt.

7. Verbindung der Formel I nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, worin  $R^3$  t-Butyl darstellt.

8. Verbindung der Formel I nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, worin  $R^4$  Cyclopentyl oder Cyclohexyl darstellt.

9. Verbindung der Formel I nach Anspruch 8, worin  $R^4$  Cyclopentyl darstellt.

10. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R^3$  t-Butyl und  $R^4$  Cyclopentyl darstellen.

11. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$  und  $R^3$  jeweils t-Butyl und  $R^4$  Cyclopentyl darstellen.

12. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R^3$  Cyclohexyl und  $R^4$  Cyclopentyl darstellen.

13. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ , und  $R^3$  und  $R^4$  jeweils Cyclohexyl darstellen.

14. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$  Cyclopentylmethyl,  $R^3$  t-Butyl und  $R^4$  Cyclobutyl darstellen.

15. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$  Hydroxy,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R^3$  t-Butyl und  $R^4$  Cyclobutyl darstellen.

16. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Me}$ ,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R^3$  t-Butyl und  $R^4$  Cyclopentyl darstellen.

17. Verbindung der Formel I wie definiert in Anspruch 1, worin  $R^1$   $\text{NHSO}_2\text{Ph}$ ,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R^3$  t-Butyl und  $R^4$  Cyclopentyl darstellen.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine gegen virale Hepatitis-C wirksame Menge einer Verbindung der Formel I nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 17 oder ein pharmazeutisch-akzeptables bzw. annehmbares Salz davon, in Mischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen bzw. annehmbaren Trägermedium oder Hilfsstoff.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, weiterhin umfassend eine therapeutisch wirksame Menge von ein oder mehreren anderen Anti-HCV-Mitteln.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das andere Anti-HCV-Mittel ausgewählt ist aus:  $\alpha$ -Interferon oder pegyliertem  $\alpha$ -Interferon.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19 oder 20, worin das andere Anti-HCV-Mittel Ribavirin darstellt.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, 20 oder 21, worin das andere Anti-HCV-Mittel ausgewählt ist aus Inhibitoren von: Helicase, NS2/3-Protease und Interner Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES).
23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, 20 oder 21, worin das andere Anti-HCV-Mittel einen Inhibitor von HCV-Polymerase darstellt.
24. Verwendung einer Verbindung der Formel I nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Vorbeugung von viraler Hepatitis-C-Infektion.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament ein oder mehrere Anti-HCV-Mittel umfasst.
26. Verwendung nach Anspruch 25, worin das andere Anti-HCV-Mittel ausgewählt ist aus:  $\alpha$ -Interferon oder pegyliertem  $\alpha$ -Interferon.
27. Verwendung nach Anspruch 25, worin das andere Anti-HCV-Mittel Ribavirin darstellt.
28. Verwendung nach Anspruch 25, worin das andere Anti-HCV-Mittel ausgewählt ist aus Inhibitoren von: Helicase, NS2/3-Protease und Interner Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES).
29. Verwendung nach Anspruch 25, worin das andere Anti-HCV-Mittel einen Inhibitor von HCV-Polymerase darstellt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen