



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 481**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01968040 .4**

96 Fecha de presentación : **31.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1320540**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Inhibidores peptidomiméticos de proteasa.**

30 Prioridad: **31.08.2000 US 229398 P**
21.03.2001 US 277641 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.09.2009

73 Titular/es:
VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
130 Waverly Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Babine, Robert, Edward;**
Chen, Shu-Hui;
Lamar, Jason, Eric;
Snyder, Nancy, June;
Sun, Xicheng;
Tebbe, Mark, Joseph;
Victor, Frantz;
Wang, Q., May;
Yip, Yvonne, Yee, Mai;
Collado, Ivan;
García-Paredes, Cristina;
Parker, Raymond, Samuel, III;
Jin, Ling;
Guo, Deqi y
Glass, John, Irvin

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores peptidomiméticos de proteasa.

5 La presente invención se refiere a compuestos peptidomiméticos y a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos peptidomiméticos, y al uso de los compuestos peptidomiméticos o composiciones de los mismos en la preparación de un medicamento para inhibir la proteasa, particularmente la serina proteasa y más particularmente la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C ("HCV"). Los compuestos peptidomiméticos, como inhibidores de la proteasa NS3 de HCV, son particularmente útiles a la hora de interferir con el ciclo de vida del virus de la hepatitis C y en el tratamiento o prevención de una infección por HCV o afecciones fisiológicas asociadas con ella. La presente invención también se refiere al uso de los compuestos peptidomiméticos o composiciones farmacéuticas o kits y paquetes farmacéuticos de los mismos en la preparación de un medicamento para terapia de combinación para inhibir la replicación de HCV en células, o para tratar o prevenir una infección por HCV en pacientes. De acuerdo con la presente invención se incluyen como composiciones farmacéuticas las que comprenden un inhibidor de serina proteasa de HCV junto con un interferón que tiene actividad anti-HCV; un inhibidor de serina proteasa de HCV junto con un compuesto, distinto de un interferón, que tiene actividad anti-HCV; o un inhibidor de serina proteasa de HCV junto con un interferón que tiene actividad anti-HCV y un compuesto, distinto de un interferón, que tiene actividad anti-HCV. Los compuestos peptidomiméticos pueden prepararse usando procedimientos estereoselectivos para preparar intermedios de bicicloprolinato quirales útiles en la síntesis de los compuestos peptidomiméticos.

20 La infección por el HCV es un problema médico humano fascinante y actualmente se ha reconocido como el agente causante de la mayoría de los casos de hepatitis no A y no B.

25 Se cree que el HCV infecta crónicamente al 3% de la población mundial [A. Alberti y col., "Natural History of Hepatitis C. *J. Hepatology*, 31, (Supl. 1), 17-24 (1999)]. Sólo en los Estados Unidos el índice de infección es del 1,8% o de 3,9 millones de personas [M.J. After, *Hepatitis C Virus Infection in the United States*". *J. Hepatology*, 31, (Supl. 1), 88-91(1999)]. De todos los pacientes infectados, alrededor del 70% desarrollan una infección crónica que se cree que es una causa fundamental de cirrosis y carcinoma hepatocelular. [D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C," *J. Viral Hepatitis*, 6, 35-47 (1999)].

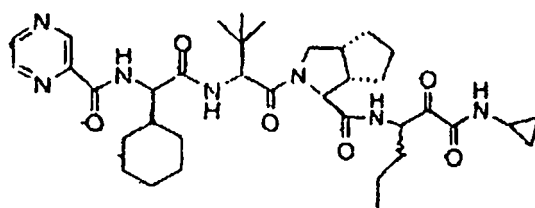
30 La replicación del VHC incluye la codificación genómica de una poliproteína de 3010-3033 aminoácidos [Q.-L. Choo, *et al.*, "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2451-2455 (1991); N. Kato *et al.*, "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa *et al.*, "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", *J. Virol.*, 65, 1105-1113 (1991)]. Se supone que las proteínas no estructurales (NS) del VHC proporcionan la maquinaria catalítica esencial para la replicación viral. Las proteínas NS se obtienen por escisión proteolítica de la poliproteína [R. Bartenschlager *et al.*, "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", *J. Virol.*, 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui *et al.* "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", *J. Virol.*, 67, 2832-2843 (1993); A. Grakoui *et al.*, Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", *J. Virol.*, 67, 1385-1395 (1993); L. Tomei *et al.*, "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", *J. Virol.*, 67, 4017-4026 (1993)]. De hecho, se ha demostrado que los primeros 181 aminoácidos de NS3 (restos 1027-1207 de la poliproteína viral) contienen el dominio de serina proteasa de NS3 que procesa los cuatro sitios cadena abajo de la poliproteína de VHC [C. Lin *et al.*, "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", *J. Virol.*, 68, 8147-8157 (1994)]. La proteína 3 NS del VHC (NS3) contiene una actividad serina proteasa que ayuda al procesamiento de la mayoría de las enzimas virales y, por lo tanto, se considera esencial para la replicación e infectividad viral. La esencialidad de la proteasa NS3 se dedujo del hecho de que mutaciones en la proteasa NS3 del virus de la fiebre amarilla reducen la infectividad viral [F.J. Chambers *et al.*, "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8898-8902 (1990)]. Más recientemente, se demostró que mutaciones en el sitio activo de la proteasa NS3 de VHC podían anular completamente la infección por VHC en un modelo de chimpancé [C.M. Rice *et al.* "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*". *J. Virol.*, 74(4) 2046-51 (2000)]. La proteasa de serina NS3 de VHC también se considera esencial para la replicación viral tal cual y su cofactor asociado, NS4A, ayuda al procesamiento de todas las enzimas virales. Este procesamiento parece ser análogo al realizado por la aspartil proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"). Además, el uso demostrado de inhibidores de proteasas de VIH como potentes agentes antivirales en el ser humano demuestra que la interrupción de una etapa de procesamiento de proteína proteasas en el ciclo de vida viral produce agentes terapéuticamente activos. Por consiguiente, la enzima proteasa es una diana atractiva para el descubrimiento de fármacos.

65 Se han descrito varios posibles inhibidores de proteasas de VHC. Las Publicaciones PCT Número WO 00/09558, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, W098/46630, WO 98/17679 y WO 97/43310, la Patente de Estados Unidos N° 5.990.276, M. Llinás-Brunet *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1713-1718 (1998), W. Han *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 711-713 (2000). R. Dunsdon *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 1571-1579 (2000), M. Llinás-Brunet *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2267-2270 (2000) y S. LaPlante *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2271-2274 (2000) describen, cada uno, posibles inhibidores de la proteasa NS3 de VHC. Desafortunadamente, actualmente no se dispone de inhibidores de serina proteasa como agentes anti-VHC.

De hecho, no existen terapias anti-VHC excepto el interferón- α , la combinación de interferón- α /ribavirina y, más recientemente, el interferón- α pegilado. Sin embargo, los porcentajes de respuesta sostenida para las terapias de interferón- α e interferón- α /ribavirina tienden a ser bajos (<50%) y los efectos secundarios presentados por las terapias tienden a ser significativos y severos [M.A. Walker, "Hepatitis C Virus: an Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, 518-529 (1999); D. Moradpour *et al.*, "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C", Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, 1199-1202 (1999); H.L.A. Janssen *et al.*, "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis", J. Hepatol., 21, 241-243 (1994); y P.F. Renault *et al.*, "Side effects of alpha interferon", Seminars in Liver Disease 9, 273-277 (1989)]. Además, las terapias con interferón sólo inducen remisión a largo plazo en únicamente una fracción (~25%) de los casos [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, 279-288 (1994)]. Los problemas mencionados anteriormente con las terapias de interferón- α han llevado al estudio clínico y al desarrollo de compuestos de interferón- α modificados pegilados como agentes terapéuticos mejorados contra el VHC. En vista de la situación actual en relación con las terapias anti-VHC está claro que existe la necesidad de terapias más eficaces y mejor toleradas. Además, la síntesis de compuestos peptidomiméticos complejos ha estado obstaculizada durante mucho tiempo por la naturaleza no estereoselectiva de la mayoría de los procedimientos orgánicos sintéticos. Es bien sabido que la actividad terapéutica de los enantiómeros de los compuestos peptidomiméticos varía ampliamente. Por lo tanto, es muy beneficioso proporcionar estos procedimientos sintéticos estereoespecíficos. Los intentos previos de sintetizar intermedios de bicicloprolinato quiralmente específicos útiles en la síntesis de los presentes inhibidores de proteasa peptidomiméticos terapéuticos han tenido el inconveniente de ser no enantioselectivos o diastereoselectivos, o implicar rutas sintéticas largas, o ser poco adecuados para preparar grandes cantidades de producto. De esta manera, también existe la necesidad de un medio para preparar grandes cantidades de bicicloprolinatos de una manera diastereoselectiva y en una forma enantioméricamente enriquecida.

Sumario de la invención

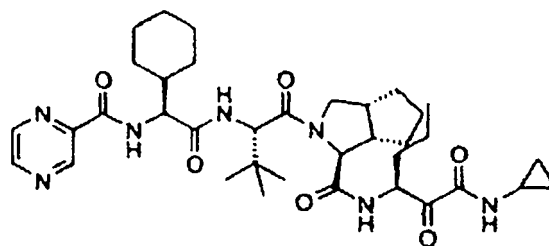
La presente invención se refiere a un compuesto



BW.

o sales farmacéuticamente aceptables y profármacos del mismo, solvatos de dicho compuesto, sus sales y sus profármacos, y

compuesto



CU.

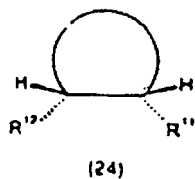
o sales farmacéuticamente aceptables y profármacos del mismo, solvatos de dicho compuesto, sus sales y sus profármacos.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto BW o CU y el uso del compuesto BW o CU en la preparación de un medicamento para inhibir la proteasa de HCV, o tratar o prevenir una infección por HCV en pacientes o una afección fisiológica relacionada con la infección. Se describe un procedimiento estereoselectivo para preparar un compuesto de bicicloprolinato quirale que es un intermedio útil en la preparación de un compuesto BW y CU. El procedimiento sintético comprende las etapas de:

ES 2 325 481 T3

(a) escindir y ciclar un compuesto de fórmula 24

5



10

en la que:

15



es cicloalquilo opcionalmente sustituido o arilcicloalquilo opcionalmente sustituido condensado;

20

R^{11} es $-\text{CO}_2R^{13}$;

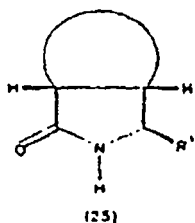
R^{12} es un aducto de glicinimida imínica;

R^{13} es un grupo protector de ácido o un grupo alifático opcionalmente sustituido;

25

en condiciones de escisión y ciclación para formar un compuesto de fórmula 25

30



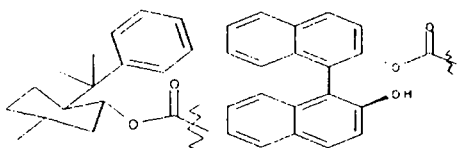
35

en la que:

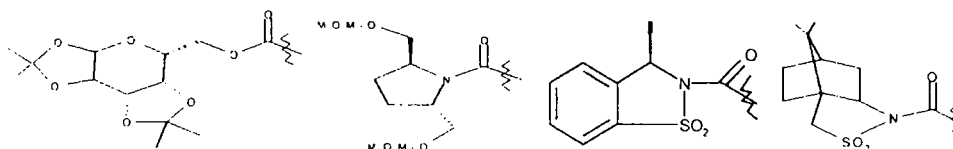
40

R^{14} es $-\text{CONR}^{13}R^{15}$, $-\text{CN}$;

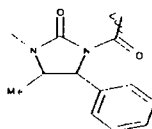
45



50



55



60

o $-\text{CO}_2R^{16}$;

R^{15} es un grupo alifático opcionalmente sustituido:

65

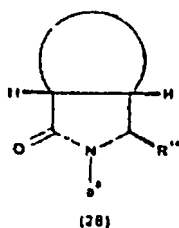
R^{16} es un grupo protector de ácido, arilo opcionalmente sustituido o un grupo alifático opcionalmente sustituido; y

ES 2 325 481 T3

(b) proteger el nitrógeno del resto lactama del compuesto de fórmula 25 con un grupo protector de amida para formar un compuesto de fórmula 26

5

10



15

en la que:

p^0 es un grupo protector de amida;

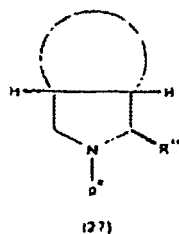
R^{14} es como se describe en el presente documento; y

20

(c) reducir el compuesto de fórmula 26 en condiciones de reducción para formar un compuesto de fórmula 27

25

30



35

en la que:

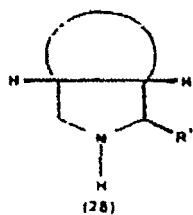
p^0 y R^{14} son como se describen en el presente documento; y

40

(d) desproteger el compuesto de fórmula 27 en condiciones de desprotección para formar un compuesto de fórmula 28

45

50



en la que:

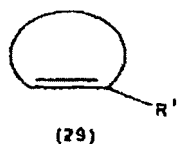
55

R^{14} es como se describe en el presente documento.

60

La invención también se refiere al procedimiento sintético anterior que comprende adicionalmente la etapa en la que el compuesto de fórmula 24 se prepara realizando una adición de Michael con un compuesto de glicinimida imínica sobre un compuesto de fórmula 29

65



en la que:

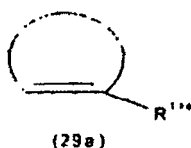


es cicloalqueno opcionalmente sustituido o arilcicloalqueno condensado opcionalmente sustituido;

10 R^{11} es $-CO_2R^{13}$;

donde:

el compuesto de fórmula 29 puede prepararse por esterificación de un compuesto de fórmula 29a



en la que:



es cicloalqueno opcionalmente sustituido o arilcicloalqueno condensado opcionalmente sustituido;

30 R^{11a} es $-CHO$, $-COR^{15}$, $-C\equiv N$ o $-CONR^{15}R^{15}$; y

R^{15} es como se describe en este documento.

35 Particularmente, un especialista en la técnica conocerá que la conversión de cetonas en ésteres puede realizarse, por ejemplo, por una reacción de Bayer-Villiger. La conversión de nitrilos y amidas en ésteres puede realizarse, por ejemplo, por hidrólisis acuosa seguido de esterificación adicional. La conversión de aldehídos en ésteres puede realizarse, por ejemplo, por oxidación del aldehído seguido de esterificación.

40 Otro aspecto de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden, además de uno o más de los inhibidores de la serina proteasa de HCV BW y CU, uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Otro aspecto de la invención es el uso de los compuestos BW y CU para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de uno o más de los inhibidores de la serina proteasa de HCV BW y CU; uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestran actividad anti-HCV; y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV.

55 La invención también se refiere al uso de uno o más de los inhibidores de la serina proteasa de HCV BW y CU junto con uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, para preparar un medicamento para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente que lo necesita.

60 La presente invención también se refiere a un kit o paquete farmacéutico para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente, en el que el kit o paquete farmacéutico comprende una pluralidad de recipientes separados, donde al menos uno de dichos recipientes contiene uno o más de los inhibidores de la serina proteasa de HCV BW y CU (solo o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestran actividad anti-HCV, (solo o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable) y, opcionalmente, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV (solo o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV.

La cantidad del inhibidor(es) de la serina proteasa de HCV, interferón(es) o compuesto(s) anti-HCV en cualquiera de las aplicaciones anteriores puede ser una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad subclínica eficaz anti-HCV o combinaciones de las mismas, siempre que la combinación final de inhibidor(es) de la serina proteasa de HCV, interferón(es) o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestra actividad anti-HCV, y/o compuesto(s) anti-HCV, comprenda una cantidad farmacéuticamente eficaz de compuestos que sea eficaz en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior y otros aspectos, características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, todos ellos dados únicamente a modo de ilustración, y que no son limitantes de la presente invención, en el que:

La Figura 1 muestra la inhibición de la acumulación de ARN del replicón de VHC después de 48 horas de tratamiento de células que contienen replicón con el Compuesto CU e interferón alfa-2B, individualmente o en combinación.

La Figura 2 muestra gráficamente la concavidad del isobol mostrada por compuestos usados en combinación que son antagonistas, aditivos y sinérgicos de acuerdo con los procedimientos de cálculo de sinergia de Greco, Park y Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327).

La Figura 3 muestra la relación geométrica entre α y la cantidad de curvatura en el isobol. Se representa un isobol hipotético al nivel de efecto E=50% con un isobol de línea recta que se esperaría con aditividad. M es el punto de intersección de la línea $y = x$ y el isobol hipotético, N es el punto de intersección de la línea $y = x$ y el isobol de línea recta, O es el origen (0,0), S proporciona una medida de la cantidad de curvatura en el isobol, donde $S = ON/OM$. ON es la distancia de O a N y OM es la distancia de O a M. El parámetro α está relacionado con S por la ecuación $\alpha = 4(S^2 - S)$.

La Figura 4 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 6 diluciones de cada compuesto en el Experimento 1.

La Figura 5 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón alfa-2A usando 6 diluciones de cada compuesto en el Experimento 2.

La Figura 6 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 3.

La Figura 7 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón alfa-2A usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 4.

La Figura 8 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón tau ovino usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 5.

La Figura 9 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto EC y el interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 6.

La Figura 10 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto EC y el interferón alfa-2A usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 7.

La Figura 11 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto CU y el interferón beta usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 8.

La Figura 12 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación del compuesto EP y el interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 9.

Figura 13 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco *et al.*, *supra*, para la combinación de ribavirina e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 10.

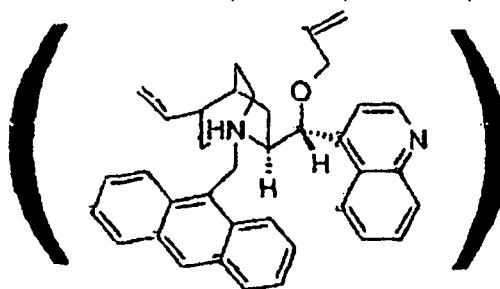
La Figura 14 muestra la inhibición de la acumulación de ARN de replicón de VHC causada por tratamiento de células que contienen replicón con (A) ribavirina sola o (B) interferón alfa-2B solo. En los dos paneles se muestra la inhibición medida así como la inhibición corregida en relación con la citotoxicidad de los compuestos.

Descripción detallada de la invención

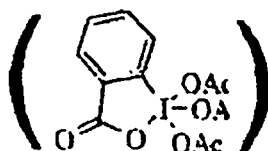
Los contenidos de cada uno de los documentos de patente y otras referencias citadas en este documento se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

Como se han usado anteriormente y como se usan a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que las siguientes abreviaturas, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

Designación	Reactivo o Fragmento
ACN	Acetonitrilo
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
BOC o Boc	carbamato de <i>terc</i> -butilo
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(dimetilamino)fosfonio
n-Bu; SnH	hidruro de tri-n-butilestaño
t-Bu	<i>terc</i> -butilo
Cbz	carbamato de bencilo
PTC quiral	catalizador de transferencia de fase quiral
DAST	trifluoruro de (dietilamino)azufre (Et ₂ NSF ₃)

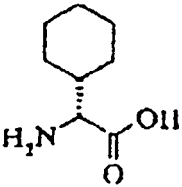


DCC	diciclocarbodiimida
DCM	diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DIC	1,3-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-(N,N-dimetilamino)piridina
reactivo de DMP	Reactivo de peryodinano de Dess-Martin



DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

ES 2 325 481 T3

	AE	análisis elemental
	EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl
5	equiv.	equivalente(s)
	Et	etilo
	Et ₂ O	éter dietílico
10	EtOH	etanol
	EtOAc	acetato de etilo
	Et ₃ Si	trietilsilano
15	Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
	H-Chg-OH	
20		
	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
25	HOBT	1-hidroxibenzotriazol
	HOSu	N-hidroxisuccinamida
30	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
	LAH	anhidrido de litio y aluminio
35	Me	Metilo
	Mel	Yoduro de metilo
	MeOH	Metanol
40	MeOC(O)Cl	cloroformiato de metilo
	MOMCl	cloruro de metoximetilo
	MOM	Metoximetilo
45	EM	espectroscopía de masas
	NaBH ₄	borohidruro sódico
	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	tartrato sódico
50	NMP	N-metil pirrolidinona
	RMN	resonancia magnética nuclear
55	P-	Unido a polímero
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio
60	TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]-dec-5-eno
	RP-HPLC	cromatografía líquida a alta presión - fase inversa
	TBSCI	cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo

65

ES 2 325 481 T3

5	TCA	ácido tricloroacético
	TFA	ácido trifluoroacético
	Tf ₂ O	anhídrido de triflato
	THF	tetrahidrofurano
	THP	tetrahidropirano
10	TLC	cromatografía de capa fina

Como se han usado anteriormente y como se usan a lo largo de la descripción de la invención, se entiende que las siguientes expresiones y términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

“Ácido bioisómero” se refiere a un grupo que tiene similitudes químicas y físicas que producen propiedades biológicas muy similares a un grupo carboxi (véase Lipinski, Annual Reports in Medicinal Chemistry, “Bioisosterism In Drug Design” 21, 283 (1986); Yun, Hwahak Sekye. “Application Of Biolsosterism To New Drug Design”, 33, 576-579, (1993); Zhao, Huaxue Tongbao, “Bioisosteric Replacement And Development Of Lead Compounds In Drug Design” 34-38, (1995); Graham, Theochem, “Theoretical Studies Applied To Drug Design:ab initio Electronic Distributions In Bio-isosteres” 343, 105-109, (1995)). Los ácidos bioisómeros ejemplares incluyen -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂-OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo y similares.

“Grupo funcional ácido” se refiere a un resto que tiene un hidrógeno ácido. Los grupos funcionales ácidos ejemplares incluyen carboxilo (-C(O)OH), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, imidazolilo, mercapto y similares, y un hidroxilo apropiado tal como un hidroxilo aromático, por ejemplo, hidroxifenilo.

“Grupo protector de ácido” se refiere a un grupo fácilmente retirable que se sabe en la técnica que protege a un hidrógeno ácido de un grupo carboxilo frente a una reacción indeseable durante los procedimientos sintéticos, por ejemplo, para bloquear o proteger la funcionalidad ácida mientras se realizan las reacciones que implican otros sitios funcionales del compuesto, y que puede retirarse de forma selectiva. Dichos grupos protectores de ácido se conocen bien por los especialistas en la técnica, y se han usado ampliamente en la protección de grupos carboxilo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 3.840.556 y 3.719.667, cuyas divulgaciones se incorporan en este documento por referencia. Para grupos protectores de ácido adecuados, véase T.W. Green y P.G.M. Wuts en “Protective Groups in Organic Chemistry” John Wiley y Sons, 1991. El grupo protector de ácido también incluye un grupo protector de ácido lábil a la hidrogenación como se define en este documento. Los grupos protectores de ácido ejemplares incluyen ésteres tales como alquilo inferior C_{1-R} sustituido y sin sustituir, por ejemplo, metilo, etilo, *t*-butilo, metoximetilo, metilmetilo, 2,2,2-tricloroetilo y similares, tetrahidropirano, fenilalquilo sustituido y sin sustituir tal como bencilo y derivados sustituidos de los mismos tales como grupos alcoxibencilo o nitrobencilo y similares, cinnamilo, dialquilaminoalquilo, por ejemplo, dimetilaminoetilo y similares, trimetilsililo, amidas e hidrazidas sustituidas y sin sustituir, por ejemplo, amidas e hidrazidas de N,N-dimetilamina, 7-nitroindol, hidrazina, N-fenilhidrazina y similares, grupos aciloxialquilo tales como pivaloiloximetilo o propioniloximetilo y similares, aroiloxialquilo tal como benzoiloxietilo y similares, alcocarbonilalquilo tal como metoxicarbonilmetilo, ciclohexiloxicarbonilmetilo y similares, alcoxi-carboniloxialquilo tal como *t*-butiloxicarboniloximetilo y similares, alcocarbonilaminoalquilo tal como *t*-butiloxi-carbonilaminometilo y similares, alquilaminocarbonilaminoalquilo, tal como metilaminocarbonilaminometilo y similares, acilaminoalquilo tal como acetilaminometilo y similares, heterociclilcarboniloxialquilo tal como 4-metil-piperazinil-carboniloximetilo y similares, dialquilaminocarbonilalquilo tal como dimetilaminocarbonilmetilo y similares, (5-(alquil inferior)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-*t*-butil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo y similares, y (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo y similares.

“Grupo protector de amina lábil para ácidos” se refiere a un grupo protector de amina como se define en este documento que se retira fácilmente por tratamiento con un ácido mientras sigue siendo relativamente estable a otros reactivos. Un grupo protector de amina lábil para ácidos preferido es BOC.

“Alifático” se refiere a alquilo, alquenilo o alquínilo como se define en este documento.

“Sustituyente(s) de grupo alifático” se refieren a sustituyentes unidos a un grupo alifático como se define en este documento incluyendo arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, cicliloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, ciclilcarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo, heteroarilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclilcarboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, -C(O) CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroaril-sulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-10,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como

“Alquilsulfonilo” se refiere a un grupo alquil-SO₂ en el que el grupo alquilo es como se ha definido anteriormente. Los grupos preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es alquilo inferior.

5 “Alquilsulfonilcarbamofilo” se refiere a un grupo alquil-SO₂.NH-C(=O)- en el que el grupo alquilo es como se describe en este documento. Los grupos alquilsulfonilcarbamofilo preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es alquilo inferior.

10 “Alquiltio” se refiere a un grupo alquil-S- en el que el grupo alquilo es como se describe en este documento. Los grupos alquiltio ejemplares incluyen metiltio, etiltio, *i*-propiltio y heptiltio.

15 “Alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono, que puede ser lineal o ramificado y que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo preferidos tienen de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquinilo lineal. “Alquinilo inferior” significa de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena que puede ser lineal o ramificada. El grupo alquinilo puede estar sustituido con uno o más halo. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen etinilo, propinilo, *n*-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, *n*-pentinilo, heptinilo, octinilo, decinilo y similares. “Alquinilo sustituido” se refiere a alquinilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más 20 “sustituyentes de grupo alifático” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes, y son como se definen en este documento.

25 “Grupo protector de amina” se refiere a un grupo que puede retirarse fácilmente que se sabe en la técnica que protege a un resto nitrógeno de un grupo amino o amida frente a una reacción indeseable durante procedimientos sintéticos y que puede retirarse de forma selectiva. El uso de grupos protectores de amina/amida se conoce bien en la técnica para grupos protectores frente a reacciones indeseables durante un procedimiento sintético y se conocen muchos grupos protectores de este tipo, por ejemplo, T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Syntheses, 2ª edición, John Wiley y Sons, Nueva York (1991), incorporado en este documento como referencia. El grupo protector de amina/amida también incluye “grupo protector de amina/amida lábil a ácidos” y “grupo protector de amina/amida lábil a la hidrogenación”. Son grupos protectores de amina/amida ejemplares acilo, incluyendo formilo, acetilo, cloroacetilo, tricloroacetilo, *o*-pnitrofenilacetilo, *o*-pnitrofenoxi-acetilo, trifluoroacetilo, acetoacetilo, 4-clorobutilo, isobutirilo, *o*-pnitrocinnainoilo, picolinoilo, acilisotiocianato, aminocaproilo, benzoilo y similares, y aciloxi incluyendo metoxi-carbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 2,2,2-trifluoroetoxicarbonilo, 2-trimetilsililetoxi-carbonilo, viniloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, *t*-butiloxicarbonilo (BOC), 1,1-dimetil-propiniloxicarbonilo, benciloxi-carbonilo (CBZ), *p*-nitrobenciloxicarbonilo, 2,4-dicloro-benciloxicarbonilo y similares. 35

40 “Grupo protector de amida” se refiere a un grupo que puede retirarse fácilmente que se sabe en la técnica que protege a un resto nitrógeno de un grupo amida frente a una reacción indeseable durante procedimientos sintéticos y que puede retirarse de forma selectiva después de su conversión en la amina. El uso de grupos protectores de amida se conoce bien en la técnica para grupos protectores frente a reacciones indeseables durante un procedimiento sintético y se conocen muchos grupos protectores de este tipo, por ejemplo, T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición, John Wiley y Sons, Nueva York (1991), incorporado en este documento como referencia. Grupo protector de amida también incluye “grupo protector de amida lábil a ácidos” y “grupo protector de amida lábil a la hidrogenación”. Son grupos protectores de amida ejemplares *o*-pnitrocinnainoilo, picolinoilo, aminocaproilo, benzoilo y similares, y aciloxi incluyendo metoxi-carbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 2,2,2-trifluoroetoxicarbonilo, 2-trimetilsililetoxi-carbonilo, viniloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, *t*-butitoxicarbonilo (BOC), 1,1-dimetil-propiniloxicarbonilo, benciloxicarbonilo (CBZ), *p*-nitrobenciloxicarbonilo, 2,4-dicloro-henciloxicarbonilo y similares. 45

50 “Aminoácido” se refiere a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por aminoácidos naturales y no naturales como se define en este documento. Un aminoácido también pretende incluir aminoácidos que tienen la estereoquímica L o D en el carbono α . Los aminoácidos preferidos son los que poseen un grupo α -amino. Los aminoácidos pueden ser neutros, positivos o negativos dependiendo de los sustituyentes de su cadena lateral. “Aminoácido neutro” se refiere a un aminoácido que contiene sustituyentes de la cadena lateral no cargados. Los aminoácidos neutros ejemplares incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina y cisteína. “Aminoácido positivo” se refiere a un aminoácido en el que los sustituyentes de la cadena lateral están cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos positivos ejemplares incluyen lisina, arginina e histidina. “Aminoácido negativo” se refiere a un aminoácido en el que los sustituyentes de la cadena lateral tienen una carga neta negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos negativos ejemplares incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Son aminoácidos preferidos α -aminoácidos. Son aminoácidos naturales ejemplares isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. “Aminoácido no natural” se refiere a un aminoácido para el que no hay ningún codón de ácido nucleico. Los aminoácidos no naturales ejemplares incluyen, por ejemplo, los isómeros D de los α -aminoácidos naturales que se han indicado anteriormente; Aib (ácido aminobutírico), β Aib (ácido 3-aminoisobutírico), Nva (norvalina), β -Ala, Aad (ácido 2-aminoadípico), β Aad (ácido 3-aminoadípico), Abu (ácido 2-aminoisobutírico), Gaba (ácido γ -aminobutírico), Acp (ácido 6-aminocaproico), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), ácido α -aminopimélico, TMSA (trimetilsilil-Ala), alle (alo-isoleucina), Nle (norleucina), *terc*-Leu, Cit (citrulina), Orn, Dpm (ácido 2,2'-diaminopiméjico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropiónico), α - o β -Nal, Cha (ciclohexil-Ala), hidroxiprolina, Sar (sarcosina), y similares; aminoácidos cíclicos; aminoácidos N^a-alquilados tales como MeGly (N^a-metilglicina), 65

ES 2 325 481 T3

EtGly (N^a-etilglicina) y EtAsn (N^a-etilasparagina); y aminoácidos en los que el α -carbono tiene dos sustituyentes en la cadena lateral. Los nombres de los aminoácidos natural y no naturales y restos de los mismos usados en este documento siguen las convenciones de nombrado sugeridas por la IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry y la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature que se exponen en “Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974)” *Biochemistry*, 14(2), (1975). Cuando los nombres y abreviaturas de aminoácidos y restos de los mismos empleados en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas difieren de los señalados, se especificarán de forma más clara los nombres y abreviaturas diferentes.

“Grupo protector de aminoácidos” se refiere a un grupo que protege a un resto ácido o amina del aminoácido u otro resto reactivo en la cadena lateral de un aminoácido, por ejemplo hidroxilo o tiol. Para ejemplos de “derivados protegidos correspondientes” de cadenas laterales de aminoácidos, véase F.W. Green y P.G.M. Wuts en “Protective Groups in Organic Chemistry” John Wiley y Sons. 1991. Los grupos protectores para un grupo ácido en un aminoácido se describen en este documento, por ejemplo en las secciones “grupo funcional ácido” y “grupo protector ácido lábil a la hidrogenación”. Los grupos protectores para un grupo amina en un aminoácido se describen en este documento, por ejemplo en las secciones “grupo protector de amina”, “grupo protector de amina lábil a ácidos” y “grupo protector de amina lábil a la hidrogenación”.

“Resto de aminoácidos” se refiere a las unidades de aminoácidos individuales incorporadas en el compuesto de la invención.

“Cadena lateral de aminoácidos” se refiere a sustituyente que se encuentra en el carbono que está entre los grupos amino y carboxi en α -aminoácidos. Las cadenas laterales de aminoácidos ejemplares incluyen isopropilo, metilo y carboximetilo para valina, alanina y ácido aspártico, respectivamente.

“Equivalente de aminoácido” se refiere a un aminoácido que puede estar sustituido por otro aminoácido en los péptidos de acuerdo con la invención sin ninguna pérdida de función apreciable. A la hora de realizar tales cambios, se realizan sustituciones de dichos aminoácidos basándose en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral, por ejemplo con respecto al tamaño, carga, hidrofobicidad, hidropaticidad e hidrofobicidad como se describe en este documento.

“Grupo aromático” se refiere a arilo o heteroarilo como se define en este documento. Los grupos aromáticos ejemplares incluyen fenilo, halo fenilo sustituido, azaheteroarilo y similares.

“Aroilo” se refiere a un grupo aril-CO- en el que el grupo arilo es como se describe en este documento. Los grupos aroilo ejemplares incluyen benzoilo, 1- y 2-naftoilo y similares.

“Arilo” se refiere a un sistema de anillos monocíclicos o multicíclicos, aromáticos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Por arilo se incluyen arilcicloalqueno condensado, arilcicloalquilo condensado, arilheterociclenilo condensado y arilheterociclilo condensado como se definen en este documento cuando se unen a través del resto arilo de los mismos. El arilo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” que pueden ser iguales o diferentes, y son como se definen en este documento. Los grupos arilo ejemplares incluyen fenilo o naftilo, o fenilo sustituido o naftilo sustituido. “Arilo sustituido” se refiere a un grupo arilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento.

“Arildiazo” se refiere a un grupo aril-diazo- en el que los grupos arilo y diazo son como se definen en este documento.

“Arileno” se refiere a un grupo arilo bivalente 1,2-, 1,3-, 1,4-, opcionalmente sustituido, en el que el grupo arilo es como se define en este documento. Los grupos arileno ejemplares incluyen fenileno opcionalmente sustituido, naftileno e indanileno. Un arileno particular es fenileno opcionalmente sustituido.

“Arileno sustituido” se refiere a un grupo arileno como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento.

“Ariloxi” se refiere a un grupo aril-O- en el que el grupo arilo es como se define en este documento. Los grupos ariloxi ejemplares incluyen fenoxi y 2-naftiloxi.

“Ariloxicarbonilo” se refiere a un grupo aril-O-CO- en el que el grupo arilo es como se define en este documento. Los grupos ariloxicarbonilo ejemplares incluyen fenoxicarbonilo y naftoxicarbonilo.

“Arilsulfonilo” se refiere a un grupo aril-SO₂, en el que el grupo arilo es como se define en este documento.

“Arilsulfonilcarbamoilo” se refiere a un grupo aril-SO₂,NH-C(=O)- en el que el grupo arilo es como se describe en este documento. Un grupo arilsulfonilcarbamoilo ejemplar es fenilsulfonilcarbamoilo.

ES 2 325 481 T3

“Arilsulfínilo” se refiere a un grupo aril-SO- en el que el grupo arilo es como se define en este documento.

“Ariltio” se refiere a un grupo aril-S- en el que el grupo arilo es como se describe en este documento. Los grupos ariltio ejemplares incluyen feniltio y naftiltio.

5

“Átomo de nitrógeno básico” se refiere a un átomo de nitrógeno hibridizado sp^2 o sp^3 que tiene un par de electrones no unidos que es capaz de protonarse. Los átomos de nitrógeno básicos ejemplares incluyen grupos imino opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido y amidino opcionalmente sustituido.

10

“Carboxi” se refiere a un grupo HO(O)C-(ácido carboxílico).

“Agente de acoplamiento” se refiere a un compuesto que reacciona con el resto hidroxilo de un resto carboxi haciéndolo de esta manera susceptible al ataque nucleofílico. Los agentes de acoplamiento ejemplares incluyen DIC, EDCI, DCC y similares.

15

“Cicloalqueno” se refiere a un sistema de anillos mono- o multicíclicos, no aromáticos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Por cicloalqueno se incluyen arilcicloalqueno condensado y heteroarilcicloalqueno condensado como se define en este documento cuando se unen a través del resto cicloalqueno de los mismos. Los tamaños de anillo preferidos de los anillos del sistema de anillos incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. “Cicloalqueno sustituido” se refiere a un grupo cicloalqueno como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. Los cicloalquenos monocíclicos ejemplares incluyen cicloalqueno, ciclohexeno, ciclohepteno y similares. Un cicloalqueno multicíclico ejemplar es norbornileno.

20

25

“Cicloalquilo” se refiere a un sistema de anillos mono- o multicíclicos, no aromáticos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferidos de los anillos del sistema de anillos incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. Por cicloalquilo se incluyen arilcicloalquilo condensado y heteroarilcicloalquilo condensado como se define en este documento cuando se unen a través del resto cicloalquilo de los mismos. “Cicloalquilo sustituido” se refiere a un grupo cicloalquilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. Los cicloalquilos monocíclicos ejemplares incluyen cicloalquilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Los cicloalquilos multicíclicos ejemplares incluyen 1-decalina, norbornilo, adamant-(1- o 2-)ilo y similares.

30

35

“Cicloalquileno” se refiere a un grupo cicloalquilo bivalente como se define en este documento que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferidos del cicloalquileno incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. Los puntos de unión en el grupo cicloalquileno incluyen patrones de unión 1,1-, 1,2-, 1,3- o 1,4-, y donde sea aplicable la relación estereoquímica de los puntos de unión es cis o trans. Los grupos cicloalquileno ejemplares incluyen (1,1-, 1,2- o 1,3-)ciclohexileno y (1,1- o 1,2-)cicloalquileno. “Cicloalquileno sustituido” se refiere a un grupo cicloalquileno como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento.

40

45

“Cíclico” o “ciclilo” se refiere a cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo o heterociclenilo como se define en este documento. El término “inferior” como se usa con respecto al término cíclico es el mismo que se ha indicado en este documento con respecto al cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo o heterociclenilo.

50

“Cicliloxi” se refiere a un grupo ciclil-O- en el que el grupo ciclilo es como se describe en este documento. Los grupos cicloalcoxi ejemplares incluyen cicloalcoxilo, ciclohexiloxi, quinuclidiloxi, pentametileno sulfuroxi, tetrahidropiranioloxi, tetrahidrotiofeniloxi, pirrolidiniloxi, tetrahidrofuranoiloxi o 7-oxabicyclo [2.2.1]heptanioloxi, hidroxitetrahidropiranioloxi, hidroxil-7-oxabicyclo[2.2.1]heptanioloxi y similares.

55

“Ciclilsulfínilo” se refiere a un grupo ciclil-S(O)- en el que el grupo ciclilo es como se describe en este documento.

“Ciclilsulfonilo” se refiere a un grupo ciclil-S(O)₂ en el que el grupo ciclilo es como se describe en este documento.

60

“Cicliltio” se refiere a un grupo ciclil-S- en el que el grupo ciclilo es como se describe en este documento.

“Diazo” se refiere a un radical -N=N- bivalente.

65

“Resto desplazable” se refiere a un grupo que, cuando se asocia con L como se define en este documento, se somete a desplazamiento por ataque nucleofílico mediante un resto amina mono- o di-sustituida con o sin presencia de un agente que facilita dicho ataque, por ejemplo, un agente de acoplamiento. Los restos desplazables ejemplares incluyen hidroxilo, oxil alifático, halo, N-oxisuccinimida, aciloxi y similares.

“Cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto/composición de acuerdo con la presente invención eficaz en la producción del efecto terapéutico deseado.

“Arlcicloalquenilo condensado” se refiere a un arilo y cicloalquenilo condensados como se definen en este documento. Son arlcicloalquenilos condensados preferidos aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el cicloalquenilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arlcicloalquenilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. “Arlcicloalquenilo condensado sustituido” se refiere a un grupo arlcicloalquenilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. Los arlcicloalquenilo condensados ejemplares incluyen 1,2-dihidronaftileno, indeno y similares.

“Arlcicloalquilo condensado” se refiere a arilo y cicloalquilo condensados como se definen en este documento. Son arlcicloalquilos condensados preferidos aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el cicloalquilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arlcicloalquilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. “Arlcicloalquilo condensado sustituido” se refiere a un grupo arlcicloalquilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. Arlcicloalquilo condensado ejemplar incluye 1,2,3,4-tetrahidronaftileno y similares.

“Arlheterociclenilo condensado” se refiere a un arilo y heterociclenilo condensados como se define en este documento. Son arlheterociclenilos condensados preferidos aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el heterociclenilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arlheterociclenilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heterociclenilo del arlheterociclenilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Arlheterociclenilo condensado sustituido” se refiere a un grupo arlheterociclenilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un arlheterociclenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heterociclenilo del arlheterociclenilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los arlheterociclenilos condensados ejemplares incluyen 3H-indolinilo, 1H-2-oxoquinolilo, 2H-1-oxoisoquinolilo, 1,2-dihidroquinolinilo, 3,4-dihidroquinolinilo, 1,2-dihidroisoquinolinilo, 3,4-dihidroisoquinolinilo y similares.

“Arlheterociclilo condensado” se refiere a acrililo y heterociclilo condensados como se definen en este documento. Son arlheterociclilos condensados preferidos aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el heterociclilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arlheterociclilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heterociclilo del arlheterociclilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Arlheterociclilo condensado sustituido” se refiere a un grupo arlheterociclilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un arlheterociclilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heterociclilo del arlheterociclilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los sistemas de anillos arlheterociclilo condensado ejemplares incluyen indolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, 1H-2,3-dihidroisoindol-2-ilo, 2,3-dihidrobenz[f]isoindol-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[g]isoquinolin-2-ilo y similares.

“Heteroarlcicloalquenilo condensado” se refiere a un heteroarilo y cicloalquenilo condensados como se definen en este documento. Los heteroarlcicloalquenilos condensados preferidos son aquellos en los que el heteroarilo de los mismos es fenilo y el cicloalquenilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarlcicloalquenilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heteroarilo del heteroarlcicloalquenilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heteroarlcicloalquenilo condensado sustituido” se refiere a un grupo heteroarlcicloalquenilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarlcicloalquenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno de la porción heteroarilo del heteroarlcicloalquenilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido correspondiente. Los heteroarlcicloalquenilos condensados ejemplares incluyen 5,6-dihidroquinolilo, 5,6-dihidroisoquinolilo, 5,6-dihidroquinoxalinilo, 5,6-dihidroquinazolinilo, 4,5-dihidro-1H-bencimidazolilo, 4,5-dihidrobenzoxazolilo y similares.

“Heteroarlcicloalquilo condensado” se refiere a heteroarilo y cicloalquilo condensados como se definen en este documento. Son heteroarlcicloalquilos condensados preferidos aquellos en los que el heteroarilo de los mismos cons-

ta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el cicloalquilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilcicloalquilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heteroarilo del heteroarilcicloalquilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heteroarilcicloalquilo condensado sustituido” se refiere a un grupo heteroarilcicloalquilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilcicloalquilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno de la porción heteroarilo del heteroarilcicloalquilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido correspondiente. Los heteroarilcicloalquilos condensados ejemplares incluyen 5,6,7,8-tetrahidroquinolinilo, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolinilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinoxalinilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinazolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-bencimidazolilo, 4,5,6,7-tetrahidrobenzoxazolilo, 1H-4-oxa-1,5-diazanaftalen-2-onilo, 1,3-dihidroimidazol-[4,5]-piridina-2-onilo y similares.

“Heteroarilheterociclenilo condensado” se refiere a un heteroarilo y heterociclenilo condensados como se definen en este documento. Son heteroarilheterociclenilos condensados preferidos aquellos en los que el heteroarilo de los mismos consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el heterociclenilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilheterociclenilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heteroarilo o heterociclenilo del heteroarilheterociclenilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heteroarilheterociclenilo condensado sustituido” se refiere a un grupo heteroarilheterociclenilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilheterociclenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heteroarilo del heteroarilheterociclenilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido correspondiente.

El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heteroarilo o heterociclenilo del heteroarilheterociclenilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los heteroarilheterociclenilos condensados ejemplares incluyen 7,8-dihidro[1,7]naftiridinilo, 1,2-dihidro[2,7]-naftiridinilo, 6,7-dihidro-3H-imidazo[4,5-c]piridilo, 1,2-dihidro-1,5-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,6-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,7-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,8-naftiridinilo, 1,2-dihidro-2,6-naftiridinilo y similares.

“Heteroarilheterociclilo condensado” se refiere a heteroarilo y heterociclilo condensados como se definen en este documento. Son heteroarilheterociclicos condensados preferidos aquellos en los que el heteroarilo de los mismos consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el heterociclilo consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilheterociclilo condensado como una variable puede unirse a través de cualquier átomo del sistema de anillos del mismo capaz de ello. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de la porción heteroarilo o heterociclilo del heteroarilheterociclilo condensado define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heteroarilheterociclilo condensado sustituido” se refiere a un grupo heteroarilheterociclilo condensado como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilheterociclilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heteroarilo del heteroarilheterociclilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido correspondiente. El átomo de nitrógeno o azufre de la porción heteroarilo o heterociclilo del heteroarilheterociclilo condensado también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los heteroarilheterociclicos condensados ejemplares incluyen 2,3-dihidro-1H-pirrol [3,4-b]quinolin-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[b][1,7]naftiridin-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[b][1,6]naftiridin-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido[3,4-b]indol-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido[4,3-b]indol-2-ilo, 2,3-dihidro-1H-pirrol [3,4-b]indol-2-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[3,4-b]indol-2-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[4,3-b]indol-3-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[4,5-b]indol-2-ilo, 5,6,7,8-tetrahidro[1,7]naftiridilo, 1,2,3,4-tetrahidro[2,7]naftiridilo, 2,3-dihidro[1,4]dioxino[2,3-b]piridilo, 2,3-dihidro-[1,4]dioxino[2,3-b]piridilo, 3,4-dihidro-2H-1-oxa[4,6]diazanaftalenilo, 4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo [4,5-c]piridilo, 6,7-dihidro[5,8]diazanaftalenilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,5]-naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,6]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,7]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,8]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[2,6]naftiridinilo y similares.

“Halo” se refiere a fluoro, cloro, bromo o yodo. Se prefieren fluoro, cloro o bromo, y se prefieren más fluoro o cloro.

“Heteroaróilo” se refiere a un grupo heteroaril-CO- en el que el grupo heteroarilo es como se describe en este documento. Los grupos heteroaróilo ejemplares incluyen tiofenoílo, nicotinoílo, pirrol-2-ilcarbonilo, 1- y 2-naftoílo, piridinoílo y similares.

“Heteroarilo” se refiere a un sistema de anillos monocíclicos o multicíclicos, aromáticos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono del sistema de anillos es o son elementos hetero distintos de

carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente, el sistema de anillos incluye de 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferidos de los anillos del sistema de anillos incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Por heteroarilo se incluyen heteroarilcicloalqueno condensado, heteroarilcicloalquilo condensado, heteroarilheterociclenilo condensado y heteroarilheterociclilo condensado como se define en este documento cuando se unen a través del resto heteroarilo de los mismos. “Heteroarilo condensado” se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de heteroarilo define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. Un átomo de nitrógeno de un heteroarilo puede ser un átomo de nitrógeno básico también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido correspondiente. Los grupos heteroarilo y heteroarilo sustituido ejemplares incluyen pirazinilo, tienilo, isotiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, furazanilo, pirrolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, piridazinilo, quinoxalino, ftalazinilo, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[2,1-b]tiazolilo, benzofurazanilo, azaindolilo, bencimidazolilo, benzotienilo, tienopiridilo, tienopirimidilo, pirrolpiridilo, imidazopiridilo, benzozaindolilo, 1,2,4-triazinilo, benzotiazolilo, furanilo, imidazolilo, indolilo, indolizino, isoxazolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, pirazinilpiridazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo y similares. Un grupo heteroarilo preferido es pirazinilo.

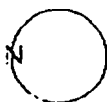
“Heteroarildiazo” se refiere a un grupo heteroaril-azo- en el que los grupos heteroarilo y azo son como se definen en este documento.

“Heteroarildiilo” se refiere a un radical bivalente obtenido a partir de un heteroarilo, donde el heteroarilo es como se describe en este documento. Un radical heteroarildiilo ejemplar es piridinadiilo opcionalmente sustituido.

“Heteroarilsulfonilcarbamoilo” se refiere a un grupo heteroaril-SO₃-NH-C(=O)- en el que el grupo heteroarilo es como se describe en este documento.

“Heterociclenilo” se refiere a un sistema de anillos hidrocarbonados, monocíclicos o multicíclicos, no aromáticos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono del sistema de anillos es o son elementos hetero distintos de carbono, por ejemplo átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno. Preferiblemente, el anillo incluye de 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferidos de los anillos del sistema de anillos incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. Por heterociclenilo se incluyen arilheterociclenilo condensado y heteroarilheterociclenilo condensado como se define en este documento cuando se unen a través del resto heterociclenilo de los mismos. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de heterociclenilo define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heterociclenilo sustituido” se refiere a un grupo heterociclenilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heterociclenilo puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre del heterociclenilo también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los grupos azaheterociclenilo monocíclico ejemplares incluyen 1,2,3,4-tetrahidropiridina, 1,2-dihidropiridilo, 1,4-dihidropiridilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridina, 1,4,5,6-tetrahidropirimidina, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 2-imidazolinilo, 2-pirazolinilo y similares. Los grupos oxaheterociclenilo ejemplares incluyen 3,4-dihidro-2H-pirano, dihidrofuranilo y fluorodihidrofuranilo. Un grupo oxaheterociclenilo multicíclico ejemplar es 7-oxabicyclo[2.2.1]heptenilo. Los anillos de tiaheterociclenilo monocíclico ejemplares incluyen dihidrotiofenilo y dihidrotiopirano.

“Heterociclilo” se refiere a un sistema de anillos monocíclicos o multicíclicos, saturados, no aromáticos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono del sistema de anillos es o son elementos hetero distintos de carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente, el sistema de anillos contiene de 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferidos de los anillos del sistema de anillos incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. Por heterociclilo se incluyen arilheterociclilo condensado y heteroarilheterociclilo condensado como se define en este documento cuando se unen a través del resto heterociclilo de los mismos. La designación de aza, oxa o tia como prefijo antes de heterociclilo define que está presente al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como un átomo del anillo. “Heterociclilo sustituido” se refiere a un grupo heterociclilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. El átomo de nitrógeno de un heterociclilo puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o azufre del heterociclilo también puede estar opcionalmente oxidado para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los anillos heterociclilo monocíclico ejemplares incluyen piperidilo, pirrolidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolidinilo, 1,3-dioxolanilo, 1,4-dioxanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirano y similares.



ya que el azaheterociclilo monocíclico sustituido está sustituido directamente o a través de un enlazador mediante al menos un sustituyente que es, o incluye, o está sustituido con un grupo aromático como se define en este documento; por ejemplo arilo, heteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróílo o su análogo tioxo, aroíloxi, heteroaróíloxi, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, arilsulfino, heteroarilsulfino, ariltio, heteroariltio, arildiazo, heteroarildiazo, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$ donde al menos uno de Y^1 y Y^2 está incluido o está sustituido con un resto arilo o heteroarilo. Los enlazadores preferidos incluyen $-C(O)-$, $-OC(O)-$, alquilo inferior, alcoxi inferior, alqueno inferior, $-O-$, $-S-$, $-C(O)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, NR^{80} , donde R^{80} es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heteroarilo. Son enlazadores particularmente preferidos $-C(O)-$ y $-OC(O)-$. “Azaheterociclilo multicíclico sustituido” se refiere a un grupo azaheterociclilo multicíclico como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento. “Azaheterociclenilo multicíclico sustituido” se refiere a un grupo azaheterociclenilo multicíclico como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento.

“Heterociclileno” se refiere a un grupo heterociclilo bivalente como se define en este documento que tiene de 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferidos del heterociclileno incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y dichos tamaños de anillo preferidos también se denominan “inferior”. Los puntos de unión en el grupo cicloalquilenilo incluyen patrones de unión 1,1-, 1,2-, 1,3- o 1,4-, y cuando sea aplicable la relación estereoquímica de los puntos de unión es *cis* o *trans*. Los grupos heterociclileno ejemplares incluyen (1,1-, 1,2- o 1,3-)piperidinileno y (1,1- o 1,2-)tetrahidrofuranóileno. “Heterociclileno sustituido” se refiere a un grupo heterociclileno como se ha definido anteriormente que está sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo del anillo” (preferiblemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son como se definen en este documento.

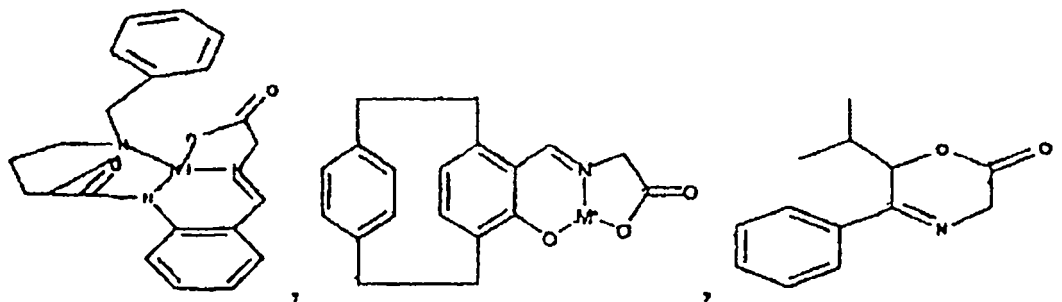
“Hidrato” se refiere a un solvato en el que la molécula o moléculas de disolvente es/son H_2O .

“Grupo protector de amina lábil a la hidrogenación” se refiere a un grupo protector de amina como se define en este documento que se retira fácilmente por hidrogenación mientras permanece relativamente estable a otros reactivos. Un grupo protector de amina lábil a la hidrogenación es Cbz.

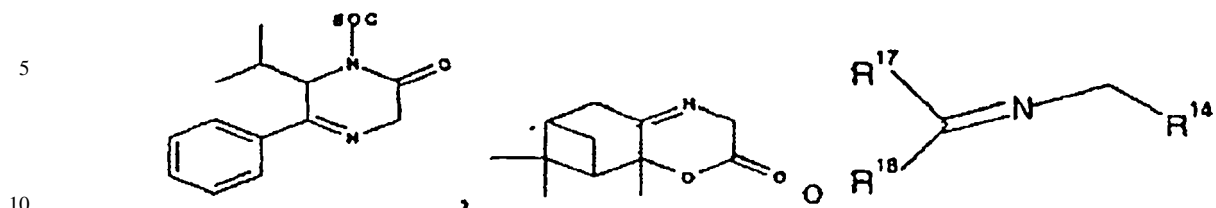
“Grupo protector de ácido lábil a la hidrogenación” se refiere a un grupo protector de ácido como se define en este documento que se retira fácilmente por hidrogenación mientras que permanece relativamente estable a otros reactivos. Un grupo protector de ácido lábil a la hidrogenación es bencilo.

“Higroscopicidad” significa sorción, vaciado de una cantidad adquirida o estado de agua suficiente para afectar a las propiedades físicas o químicas de la sustancia (Eds. J. Swarbrick y J.C. Boylan, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 10, 33).

“Derivado de glicinimida imínica” se refiere a una base imínica de Schiff de una glicina que es útil en la síntesis de alfa-aminoácidos, tanto naturales como no naturales. La funcionalidad de éster imínico puede contener uno o más centros asimétricos que pueden facilitar la estereoinducción durante el procedimiento de formación de enlaces. Además, estos derivados de glicinimida imínica pueden incorporarse en soportes poliméricos para facilitar la síntesis combinatoria. Los derivados de glicinimida imínica pueden prepararse por condensación de un éster de glicina con la cetona apropiada en presencia de un catalizador ácido. La reacción se facilita por la retirada del agua. Los derivados de glicinimida imínica se conocen bien en la técnica para usarse en procedimientos sintéticos de Adición de Michael, por ejemplo, como se describe por Guillena, G., y col., J. Org. Chem., 2000, 65, 7310-7322, incorporado en este documento como referencia. Los ejemplos particulares de derivados de glicinimida imínica de acuerdo con la invención incluyen uno seleccionado entre



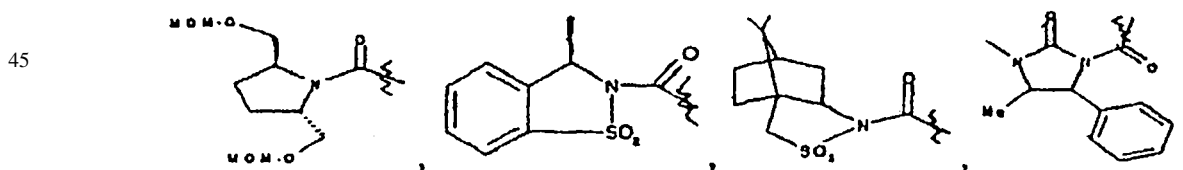
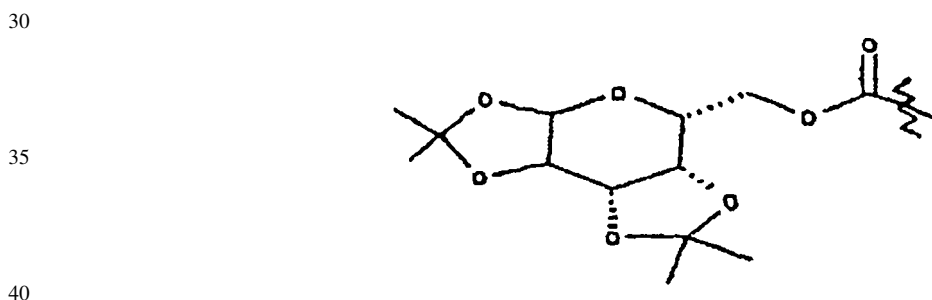
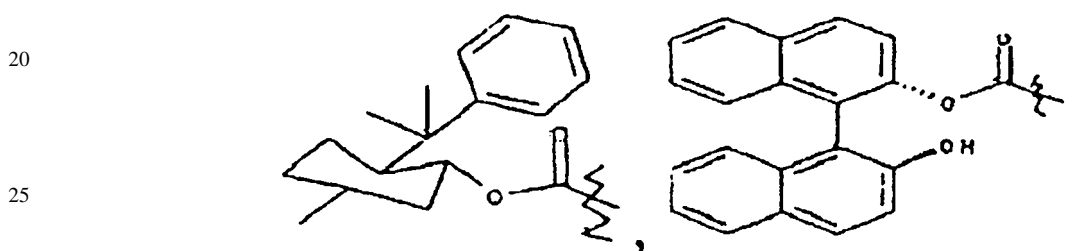
el grupo de fórmulas



en las que:

15 M^* es un metal de transición, preferiblemente CU, más preferiblemente CU^{II} .

R^{14} es $-CO_2R^{16}$, $-CN$,

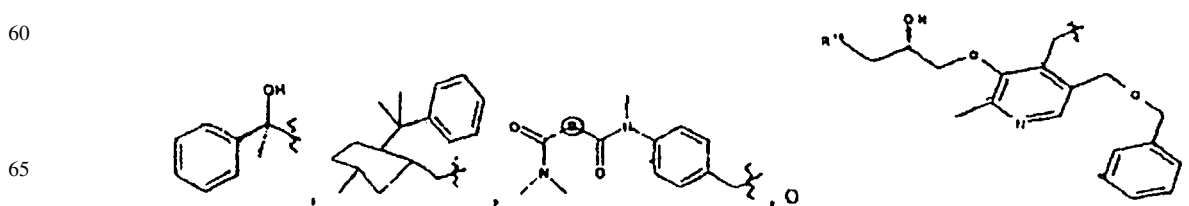


o $-CONR^{15}R^{15}$;

R^{15} es un grupo alifático opcionalmente sustituido;

55 R^{16} es un grupo protector de ácido, arilo opcionalmente sustituido o un grupo alifático opcionalmente sustituido;

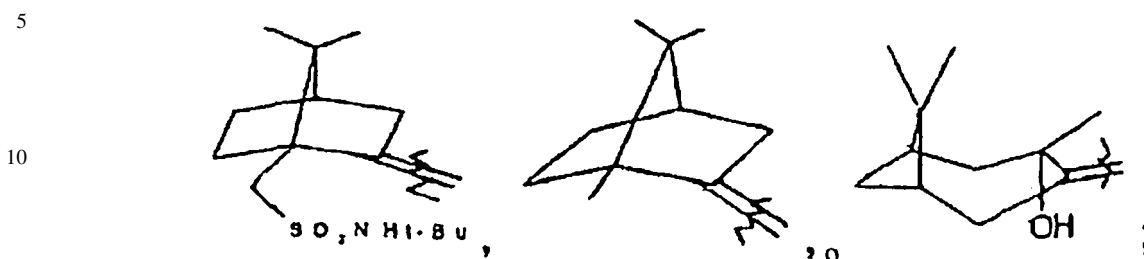
R^{17} es arilo opcionalmente sustituido, un grupo alifático opcionalmente sustituido,



ES 2 325 481 T3

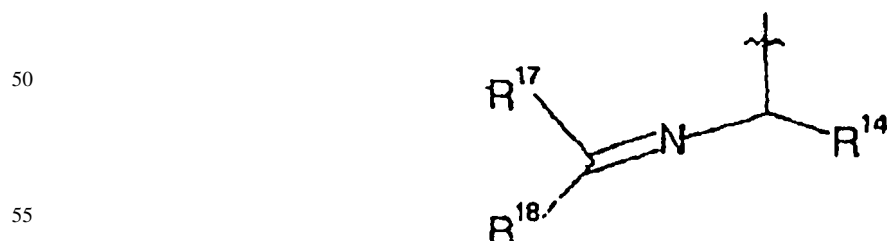
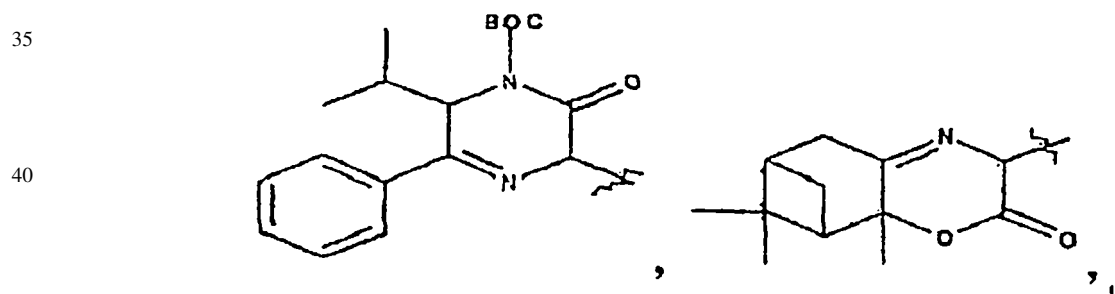
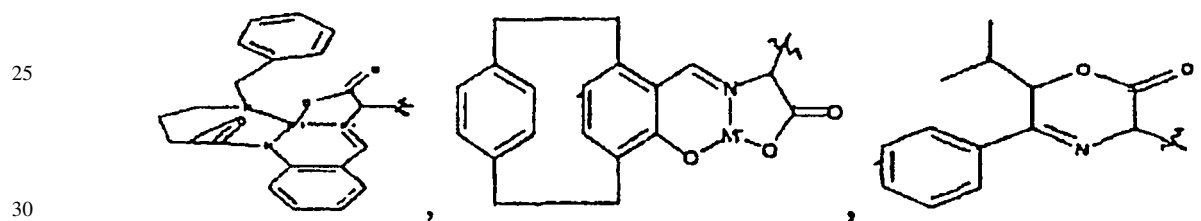
R¹⁸ es hidrógeno, alquilo o alquiltio; o arilo opcionalmente sustituido;

R¹⁷ y R¹⁸ tomados junto con el carbono al que R¹⁷ y R¹⁸ están unidos



15 y (s) es una fase sólida;

20 “Aducto del derivado de glicinimida imínica” se refiere al compuesto resultante en el que se retira un α-hidrógeno para el nitrógeno y un resto carbonilo de la porción base de Schiff y se usa para formar una unión para la formación del enlace. Los ejemplos particulares de aductos del derivado de glicinimida imínica de acuerdo con la invención incluyen uno seleccionado del grupo de fórmulas



en las que:

60 R¹⁴, R¹⁷ y R¹⁸ se definen como se ha descrito en la definición del derivado de glicina imínica en este documento.

“N-oxisticeinimida” se refiere a un resto de la siguiente estructura



“N-óxido” se refiere a un resto de la siguiente estructura



“Paciente” incluye tanto seres humanos como otros mamíferos.

“Peptidomimético” se refiere a un polímero que incluye restos de aminoácidos unidos a través de enlaces amida.

“Éster farmacéuticamente aceptable” se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen los que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano para dejar el compuesto de partida o una sal del mismo. Los grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, los obtenidos a partir de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, particularmente ácidos alcanoico, alquenoico, cicloalcanoico y alcanodioico, en los que cada resto alquilo o alquenilo ventajosamente no tiene más de 6 átomos de carbono. Los ésteres ejemplares incluyen formiatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos, etilsuccinatos y similares.

“Profármacos farmacéuticamente aceptables”, como se usa en este documento, se refiere a los profármacos de los compuestos de la presente invención que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores con una toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaces para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención. El término “profármaco” se refiere a un compuesto que se transforma fácilmente *in vivo* para producir el compuesto de partida de la fórmula anterior, por ejemplo por hidrólisis en sangre. Los grupos funcionales que pueden transformarse rápidamente por escisión metabólica *in vivo* forman una clase de grupos reactivos con el grupo carboxilo de los compuestos de la presente invención. Incluyen, pero sin limitación, grupos tales como alcanóilo (tal como acetilo, propanoilo, butanoilo y similares), aroilo sin sustituir y sustituido (tal como benzoilo y benzoilo sustituido), alcoxicarbonilo (tal como etoxicarbonilo), trialkilsililo (tal como trimetil- y trietilsililo), monoésteres formados con ácidos dicarboxílicos (tal como succinilo) y similares. Debido a la facilidad con la que se escinden los grupos metabólicamente escindibles de los compuestos de la presente invención *in vivo*, los compuestos que tienen dichos grupos actúan como profármacos. Los compuestos que tienen los grupos metabólicamente escindibles tienen la ventaja de que pueden mostrar una mayor biodisponibilidad como resultado de una mayor solubilidad y/o velocidad de absorción conferida al compuesto de partida gracias a la presencia del grupo escindible metabólicamente. Se proporciona un análisis minucioso en Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Enzymology: K. Widder y col., Ed., Academic Press, 42, 309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Development. Krogsgaard-Larsen and H. Bandaged, ed., Capítulo 5; “Design and Applications of Prodrugs” 113-191(1991); Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgaard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci., 77, 285 (1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya y col. 32, 692 (1984); Pro-drugs as Novel Delivery Systems. T. Higuchi y V. Stella. 14 A.C.S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design. E.B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press. 1987, que se incorporan en este documento como referencia.

“Sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicas u orgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos. En particular, las sales de adición de ácidos pueden prepararse haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal formada de esta manera. Las sales de adición de ácidos ejemplares incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, sulfamatos, malonatos, salicilatos, propionatos, metileno-bis- β -hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-*p*-toluolitartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, benzenosulfonatos, *p*-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatoslaurilsulfonatos y similares. Véase, por ejemplo S.M. Berge, y col., “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977) que se incorpora en este documento como referencia. También pueden prepararse sales de adición de bases haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada y aislando la sal formada de esta manera. Las sales de adición de bases incluyen sales de metales y aminas farmacéuticamente aceptables. Las sales de metales adecuadas incluyen las sales de sodio, potasio, calcio, bario, cinc, magnesio y aluminio. Se prefieren las sales de sodio y potasio. Las sales de adición de bases inorgánicas adecuadas se preparan a partir de bases de metales que incluyen hidruro sódico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de cinc y similares. Las sales de adición de aminas adecuadas se preparan a partir de aminas que tienen suficiente basicidad para formar una sal estable, y preferiblemente incluyen las aminas que se usan habitualmente en la química medicinal debido a su baja toxicidad y aceptabilidad para uso médico. Amoníaco, etilendiamina, N-metil-glucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio, trietilamina, dibencilamina, efenamina, deshidroabietilamina, N-etilpiperidina, bencilamina, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, aminoácidos básicos, por ejemplo, lisina y arginina, y dicitlohexilamina y similares.

ES 2 325 481 T3

“Sustituyentes del grupo del anillo” se refiere a sustituyentes unidos a sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos incluyendo arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, cicli-carbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, cicli-carboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoílo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoílo, N-metoxicarbamoílo, heteroarilsulfonilcarbamoílo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, alcoxicarbonilo, ciclioxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxi-carbonilo, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, cicliisulfonilo, ariltio, heteroariltio, cicliisulfonilo, ariltio, heteroariltio, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²C(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, donde Y¹, Y² e Y³ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o para cuando el sustituyente es Y¹Y²N-, entonces uno de Y¹ e Y² puede ser acilo, cicli-carbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcoxicarbonilo, ciclioxicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, como se define en este documento, y el otro de Y¹ e Y² es como se ha definido previamente, o para cuando el sustituyente es Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, Y¹ e Y² también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y¹ e Y² se unen para formar un azaheterocicli- o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros. Cuando un sistema de anillos está saturado o parcialmente saturado, los “sustituyentes del grupo del anillo” incluyen además metileno (H₂C=), oxo (O=) y tioxo (S=). Son sustituyentes de ácidos/amidas del grupo del anillo carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, C(O)-CH₂OH-C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoílo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoílo, N-metoxicarbamoílo, heteroarilsulfonilcarbamoílo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo e Y¹Y²NCO-. Son sustituyentes no ácidos polares del grupo del anillo hidroxilo, oxo (O=), tioxo (S=), acilo o su análogo tioxo, cicli-carbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, alcoxicarbonilo, ciclioxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, aciloxi, cicli-carboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-.

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

Los compuestos particulares de acuerdo con la invención son los compuestos BW y CU.

Los compuestos de la invención se suministran opcionalmente en forma de sales. Esas sales que son farmacéuticamente aceptables son de particular interés ya que son útiles en la administración de los compuestos anteriores para fines médicos. Las sales que no son farmacéuticamente aceptables son útiles en procedimientos de fabricación, para fines de aislamiento y purificación, y en algunos casos, para el uso en la separación de formas estereoisoméricas de los compuestos de la presente invención. Esto último es particularmente cierto para sales de aminas preparadas a partir de aminas ópticamente activas.

Cuando el compuesto de la invención contiene un grupo carboxi, o un bioisómero suficientemente ácido, pueden formarse sales de adición de bases y son simplemente una forma más conveniente para el uso; y en la práctica, el uso de la forma de sal supone intrínsecamente el uso de la forma de ácido libre.

Además, cuando el compuesto de la invención contiene un grupo básico, o un bioisómero suficientemente básico, pueden formarse sales de adición de ácidos y son simplemente una forma más conveniente para el uso; y en la práctica, el uso de la forma de sal supone intrínsecamente el uso de la forma de base libre.

Una realización preferida del uso de un compuesto de acuerdo con la invención en un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección que comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto BW o CU.

Otra realización preferida del uso de un compuesto de acuerdo con la invención en un procedimiento terapéutico es para el tratamiento de un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto BW o CU junto con una cantidad farmacéuticamente eficaz de otro agente terapéutico anti-HCV al paciente.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprendan, además de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV, uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Es otro objeto de la invención proporcionar una composición farmacéutica que sea eficaz, en y por sí misma, para la utilización en una terapia de combinación beneficiosa debido a que incluye una pluralidad de ingredientes activos que pueden utilizarse de acuerdo con la invención.

ES 2 325 481 T3

La invención también proporciona kits o paquetes individuales que combinan dos o más ingredientes activos útiles en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente. Un kit puede proporcionar (solo o junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable), el compuesto de BW o CU y el ingrediente activo adicional (solo o junto con un diluyente o vehículo) distinto de un agente terapéutico anti-HCV.

Los compuestos BW y CU pueden prepararse por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos como los usados hasta ahora o descritos en la bibliografía, o por procedimientos de acuerdo con la presente invención que se encuentran en este documento.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar medicamentos útiles en procedimientos de tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV; uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV; y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral para HCV.

Otro objeto de la presente invención es el uso de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV junto con uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, para preparar un medicamento para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente que lo necesita.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit o paquete farmacéutico para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente, donde el kit o paquete farmacéutico comprende una pluralidad de recipientes separados, donde al menos uno de dichos recipientes contiene uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestran actividad anti-HCV (solo o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), y, opcionalmente, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV (solo o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral para HCV.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar medicamentos útiles en un procedimiento de inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula, un inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C y opcionalmente un interferón o compuestos que inducen la producción de un interferón que tienen actividad anti-virus de la hepatitis C.

La cantidad del inhibidor(es) de la serina proteasa de HCV, interferón(es) o compuesto(s) anti-HCV en cualquiera de las solicitudes anteriores puede ser una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad eficaz anti-HCV subóptima o combinaciones de las mismas, de manera que la combinación final de inhibidor(es) de la proteasa de HCV, interferón(es) y/o compuesto(s) anti-HCV comprenda una cantidad farmacéuticamente eficaz de compuestos que sea eficaz en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente.

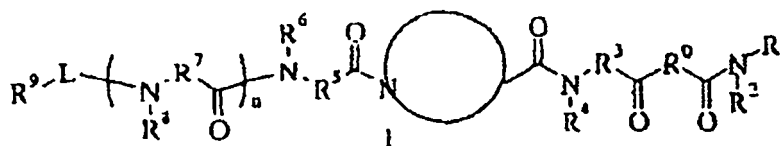
Es un objeto adicional de la invención proporcionar un procedimiento para preparar un compuesto de bicicloproi-nato quiral que sea útil en la preparación de los compuestos de acuerdo con la invención.

Preparación de Compuestos de la Invención

Los materiales de partida e intermedios de los compuestos de la invención pueden prepararse por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos, por ejemplo, procedimientos como los descritos en los Ejemplos de Referencia o sus equivalentes químico obvios.

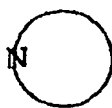
Los compuestos de la invención pueden prepararse por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos, por los que se entienden procedimientos usados hasta ahora o descritos en la bibliografía, por ejemplo, los descritos por R.C. Larock en *Comprehensive Organic Transformations*. VCH publishers (1989).

Un compuesto de fórmula I.



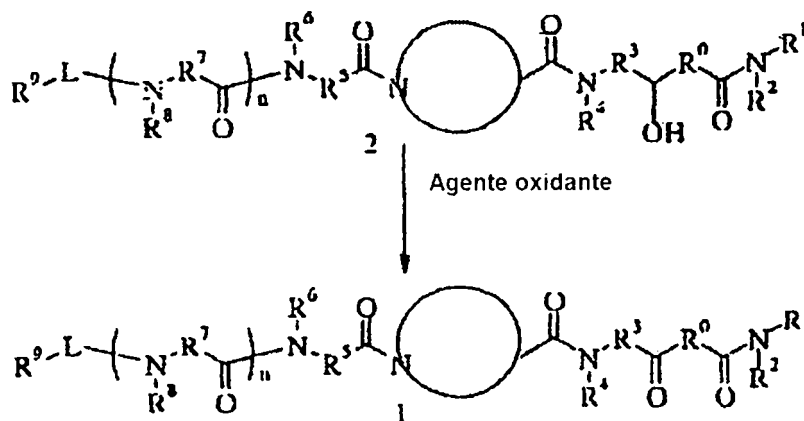
en la que las variables y el resto

5



de las mismas son como se describen en este documento, pueden prepararse por tratamiento de un compuesto de fórmula 2, en la que las variables

10



15

20

25

y el resto

30



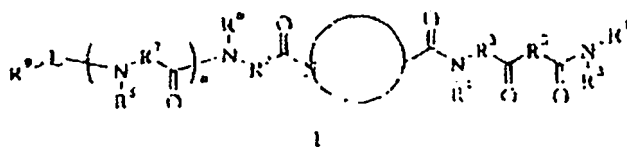
35

de las mismas son como se describen en este documento, con un agente oxidante apropiado y en condiciones apropiadas. Un agente oxidante particular es reactivo de DMP. Las condiciones particulares incluyen realizar la oxidación en un disolvente orgánico apropiado tal como diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente.

40

En un compuesto peptidomimético de fórmula I

45



50

R⁰ es un enlace de difluorometileno;

R¹ es hidrógeno, un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido;

55

cada uno de R² y R⁹ es independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido;

60

cada uno de R³, R⁵ y R⁷ es independientemente (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (metileno opcionalmente sustituido o etileno opcionalmente sustituido), (1,1- o 1,2-)cicloalquileo opcionalmente sustituido o (1,1- o 1,2-)heterociclileno opcionalmente sustituido;

cada uno de R⁴, R⁶, R⁸ y R¹⁰ es independientemente hidrógeno o un grupo alifático opcionalmente sustituido;

65



ES 2 325 481 T3

es azaheterociclilo monocíclico sustituido o azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido, o azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido donde la insaturación está en el anillo distal con respecto al anillo que tiene el $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ y al que está unido el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$: L es $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-NR^{10}S(O)_2-$; y

n es 0 ó 1, o

una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, o un solvato de dicho compuesto, su sal o su profármaco,

con la condición de que

cuando



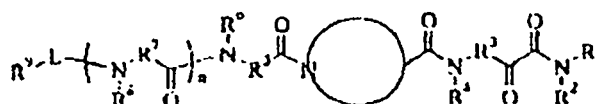
es



sustituido

entonces L sea $-OC(O)$ y R^9 sea un grupo alifático opcionalmente sustituido, o al menos uno de R^3 , R^5 y R^7 sea (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (etandiilo opcionalmente sustituido), o R^4 sea un grupo alifático opcionalmente sustituido.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural:



en la que:

R^1 es hidrógeno, un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido;

cada uno de R^2 y R^9 es independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido;

cada uno de R^3 , R^5 y R^7 es independientemente (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (metandiilo opcionalmente sustituido o etandiilo opcionalmente sustituido);

cada uno de R^4 , R^6 , R^8 y R^{10} es independientemente hidrógeno o un grupo alifático opcionalmente sustituido;



es azaheterociclilo monocíclico sustituido o azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido, o azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido donde la insaturación está en el anillo distal con respecto al anillo que tiene el resto $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ y al que está unido el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$;

L es $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-NR^{10}S(O)_2-$; y

una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, o un solvato de dicho compuesto, su sal o su profármaco,

con la condición de que

cuando

5



es

10



15

sustituido

20 el L sea -OC(O)- y R⁹ sea un grupo alifático opcionalmente sustituido, o al menos uno de R³, R³ y R⁷ sea (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (etandiilo opcionalmente sustituido) o R⁴ sea un grupo alifático opcionalmente sustituido.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁰ es un enlace.

25 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁰ es difluorometileno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹ es hidrógeno o un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

30 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹ es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹ es hidrógeno.

35 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R² es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o un grupo monocíclico opcionalmente sustituido.

40 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R² es carboximetilo, 1-carboxi-2-feniletilo, ciclopropilo, ciclobutilo, 1-ciclohexiletilo, 1-feniletilo, but-2-ilo, 1-pirid-4-iletilo, propen-3-ilo o metilbut-2-ilo; más preferiblemente ciclopropilo.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R³ es un grupo metileno alifático inferior opcionalmente sustituido.

45 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R³ es (alquilo o alqueni)metileno inferior opcionalmente halo-sustituido.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R³ es propilmetileno, 2,2-difluoroetilmetileno, 2,2,3-trifluorometileno o propen-3-ilmetileno; se prefiere más que R³ sea propilmetileno o 2,2-difluoroetilmetileno, prefiriéndose más que R³ sea propilmetileno.

50 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁴ es hidrógeno o un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

55 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁴ es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁴ es hidrógeno.

60 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁵ es un grupo metileno alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁵ es (alquil o alqueni)metileno inferior opcionalmente sustituido con (fenilo, carboxi, carboxamido o alcocarbonilo).

65 Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁵ es metilmetileno, isopropilmetileno, *t*-butilmetileno, but-2-ilmetileno, butilmetileno, bencilmetileno, 3-metilbutilmetileno, 2-metilpropilmetileno, carboximetilmetileno, carboxamidometilmetileno benciloxycarbonilmetilmetileno, benciloxycarbonilpropilmetileno, o fenilpropen-3-ilmetileno; más preferiblemente R⁵ es isopropilmetileno o *t*-butilmetileno.

ES 2 325 481 T3

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^6 es hidrógeno o un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^6 es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^6 es hidrógeno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^7 es un grupo metileno alifático inferior opcionalmente sustituido, un grupo metileno cíclico inferior opcionalmente sustituido o un (aril o heteroaril) metileno monocíclico opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^7 es alquilmetileno inferior opcionalmente sustituido, cicloalquilmetileno inferior opcionalmente sustituido o fenilmetileno opcionalmente sustituido.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^7 es metilmetileno, isopropilmetileno, *n*-propilmetileno, fenilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, *t*-butilmetileno, *s*-butilmetileno, ciclohexilmetilmetileno o fenilmetilmetileno, más preferiblemente es isopropilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, *t*-butilmetileno o *s*-butilmetileno.

Una realización preferida de acuerdo con la invención también es aquella en la que cada uno de R^3 , R^5 y R^7 es metileno monosustituido.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es también aquella en la que R^3 es metileno monosustituido y tiene una configuración (S) en el carbono unido al resto $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^8 es hidrógeno o un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^8 es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^8 es hidrógeno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^9 es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o un grupo aromático monocíclico opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^9 es alquilo inferior opcionalmente sustituido o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.

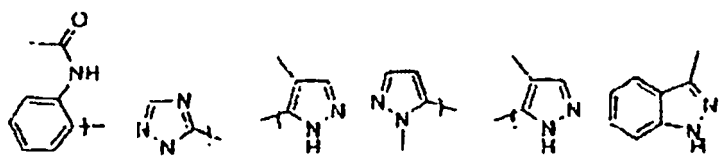
Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^9 es alquilo inferior opcionalmente sustituido con (carboxi, (alquil inferior)SO₂NH-, (alquil inferior)HNCO-, hidroxilo, fenilo, heteroarilo o (alquil inferior)OC(O)NH-), o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.

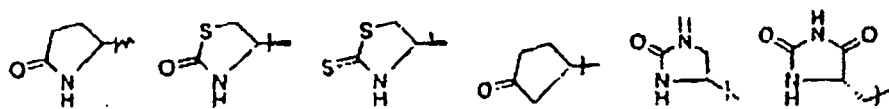
Una realización preferida adicional de acuerdo con la invención es aquella en la que R^9 es alquilo inferior sustituido con (mono- o di-)MeOC(O)NH-; más preferiblemente es 1,2-di(MeOC(O)NH)etilo o 1-(MeOC(O)NH)etilo.

Una realización preferida de acuerdo con la presente invención es aquella en la que R^9 es alquilo inferior sustituido con (carboxi, (alquil inferior)HNCO- o tetrazolilo); más preferiblemente es 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo, 3-(*N*-metilcarboxamido)propilo o 3-carboxi-2,2-dimetilpropilo; más preferiblemente es 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo o 3-(*N*-metilcarboxamido)propilo.

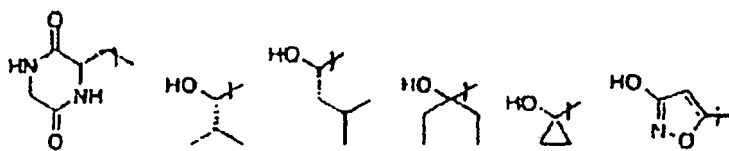
Otra realización preferida de la invención es aquella en la que R^9 es alquilo inferior opcionalmente sustituido; más preferiblemente es 1-hidroxi-2-fenyltetilo, metilo, isopropilo o *t*-butilo; más preferiblemente es metilo, isopropilo o *t*-butilo.

Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^9 se selecciona entre el grupo constituido por





5

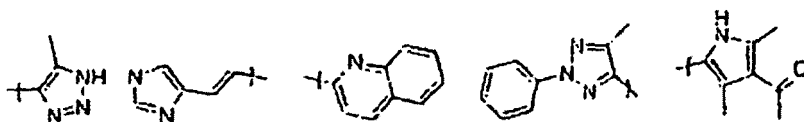


10



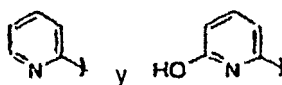
15

20



25

30



35

Otra realización preferida más de acuerdo con la invención es aquella en la que R⁹ es pirazinilo. Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹⁰ es hidrógeno o un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

40

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹⁰ es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R¹⁰ es hidrógeno.

45

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que



50

como un azaheterociclilo monocíclico sustituido es pirrolidinilo sustituido.

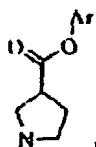
Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que

55



60

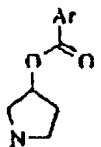
como un azaheterociclilo monocíclico sustituido es



65

opcionalmente sustituido o

5



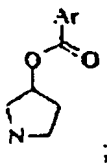
10

opcionalmente sustituido

en el que Ar es R² que comprende un resto aromático; más preferiblemente es

15

20



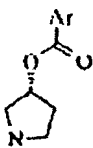
25

opcionalmente sustituido

aún más preferiblemente es

30

35



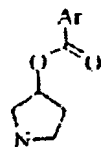
40

opcionalmente sustituido

Aún más preferiblemente

45

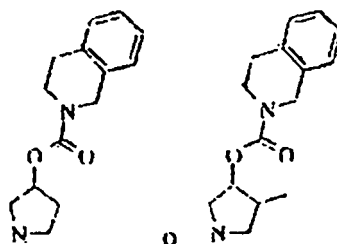
50



opcionalmente sustituido es

55

60



65

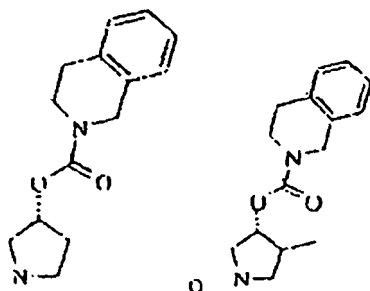
opcionalmente sustituido;

aún más preferiblemente

5

10

15



Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que

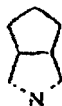
20



25

como un azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido es

30



35

opcionalmente sustituido;

más preferiblemente es

40



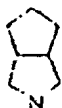
45

opcionalmente sustituido.

50

Son sustituyentes particulares para

55



hidroxi, fluoro u oxo.

60

Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que

65



ES 2 325 481 T3

como un azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido es

5



opcionalmente sustituido;

10

más preferiblemente es

15



20

aún más preferiblemente es

25



30

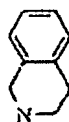
Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que

35



como un azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido es

40



45

opcionalmente sustituido.

50

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)NR^2R^1$ unido a

55



está unido con el carbono α al átomo de nitrógeno.

60

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que L es $-C(O)-$ o $-OC(O)-$.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que n es 0.

Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que n es 1.

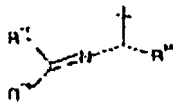
65

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{11} es $-CO_2R^{13}$.

ES 2 325 481 T3

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{12} es

5



10 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{13} es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{13} es un grupo alquilo.

15 Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{13} es alquilo inferior.

Otra realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{13} es metilo.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{14} es $-\text{CO}_2R^{16}$.

20 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{15} es alquilo.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{15} es alquilo inferior.

25 Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{15} es metilo.

Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{16} es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

30 Otra realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{16} es alquilo.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{16} es alquilo inferior.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{16} es *t*-Bu.

35 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{17} es arilo opcionalmente sustituido.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{17} es fenilo.

40 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{18} es arilo opcionalmente sustituido.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que R^{18} es fenilo.

45 Una realización particular de acuerdo con la invención es aquella en la que p^0 se selecciona entre el grupo constituido por BOC, CBz y $-\text{CO}_2$ alquilo.

Una realización preferida de acuerdo con la invención es aquella en la que p^0 es BOC.

50 Debe apreciarse que la presente invención incluye todas las combinaciones apropiadas de las agrupaciones particulares y preferidas indicada en este documento.

Un compuesto de fórmula 2, en la que las variables y el resto

55

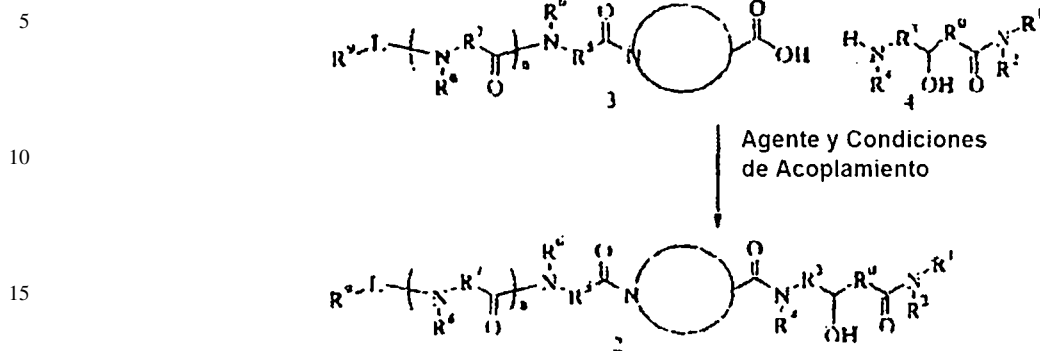


60 de las mismas son como se describen en este documento, puede prepararse por acoplamiento de un compuesto de fórmula 3, en la que las variables y el resto

65



de las mismas son como se describen en este documento, y un compuesto de fórmula 4, en la que

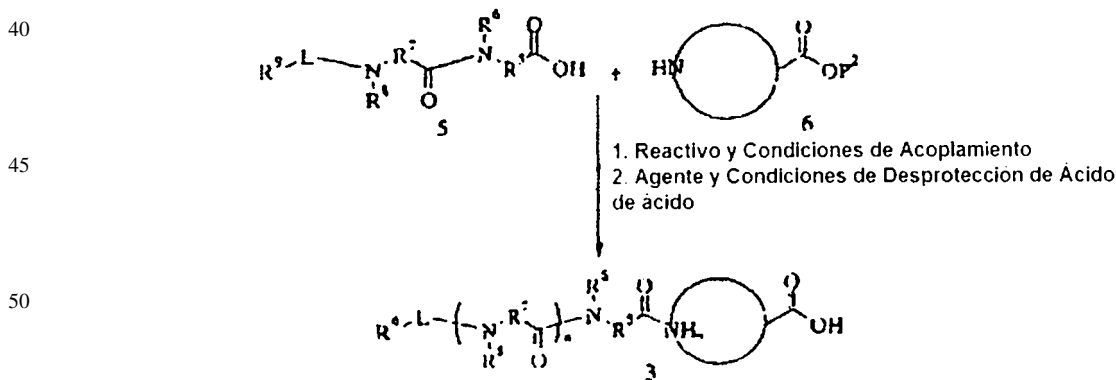


20 y las variables de los mismos son como se describen en este documento, con un agente de acoplamiento apropiado y en condiciones apropiadas. El agente y las condiciones de acoplamiento particulares incluyen el uso de DIC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF a aproximadamente 0°C o usando PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado tal como diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente.

25 Un compuesto de fórmula 3, en la que las variables y el resto



35 de las mismas son como se describen en este documento, puede prepararse por acoplamiento de un compuesto de fórmula 5, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, y un compuesto de fórmula 6, en la que P² es un grupo protector de ácido



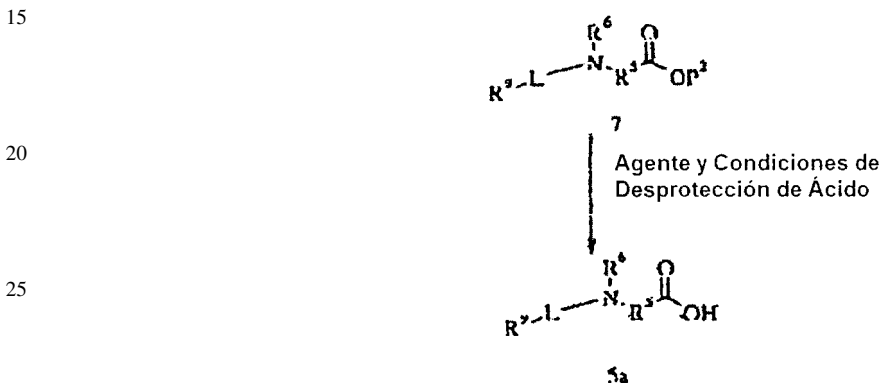
55 y el resto



65 del mismo es como se describe en este documento, con un agente de acoplamiento apropiado y en condiciones de acoplamiento apropiadas, seguido de un agente de desprotección apropiado y en condiciones de desprotección apropiadas. El agente y las condiciones de acoplamiento particulares incluyen el uso de DIC o DCC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF o diclorometano de aproximadamente 0°C a aproximadamente la temperatura

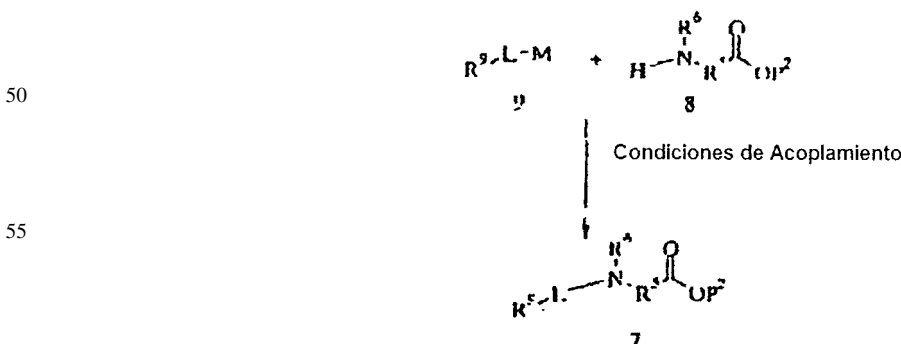
ambiente. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un agente protector de ácido particular es alquilo inferior de C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol aproximadamente a la temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 5, en la que n es 0 y las otras variables son como se describen en este documento, es decir, compuesto 5a, puede prepararse por desprotección de un compuesto de fórmula 7,



en la que P² es un ácido grupo protector y las otras variables de la misma son como se describen en este documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un agente protector de ácido particular es alquilo inferior de C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol aproximadamente a la temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 7, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por acilación de un compuesto de fórmula 8, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un compuesto de fórmula 9, en la que M es un resto desplazable y las otras variables



del mismo son como se describen en este documento, en condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan DIC o DCC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF o diclorometano de aproximadamente 0°C a aproximadamente la temperatura ambiente, o PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF o diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente; y preferiblemente las últimas condiciones. Un L particular es carbonilo. Un M particular es hidróxi o N-oxisuccinimida.

ES 2 325 481 T3

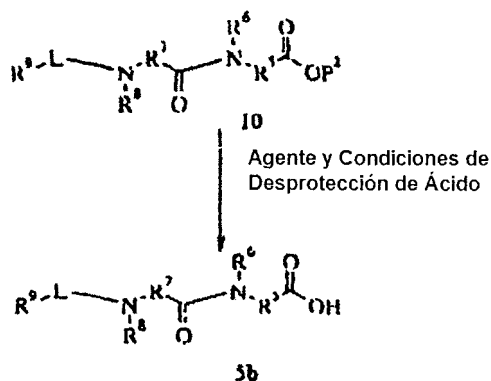
Un compuesto de fórmula 5, en la que n es 1 y las otras variables son como se describen en este documento, es decir, compuesto 5b, puede prepararse por desprotección de un compuesto de fórmula 10, en la que P² es un grupo protector de ácido

5

10

15

20



25

30

y las otras variables de la misma son como se describen en este documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector de ácido, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un agente protector de ácido particular es alquilo inferior de C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol aproximadamente a la temperatura ambiente.

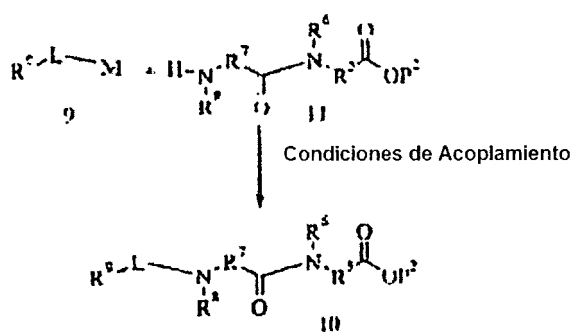
35

Un compuesto de fórmula 10, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por acilación de un compuesto de fórmula 11, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un compuesto de fórmula 9, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento,

40

45

50



55

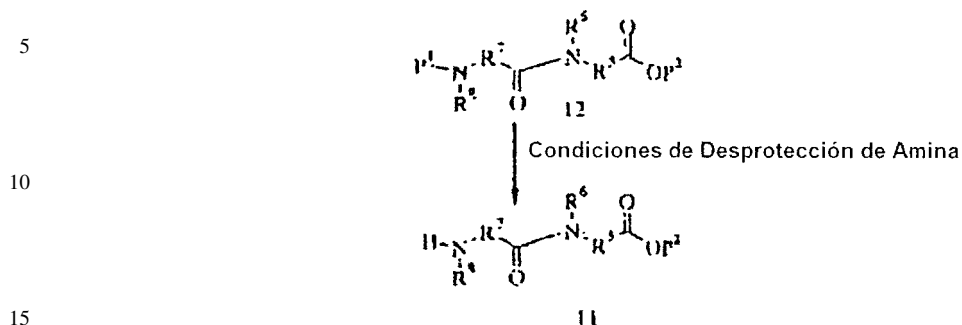
en condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan DIC o DCC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF o diclorometano de aproximadamente 0°C a aproximadamente la temperatura ambiente, o PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado tal como DMP o diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente; y preferiblemente las últimas condiciones. Un L particular es carbonilo. Un M particular es hidroxilo o N-oxisuccinimida.

60

65

ES 2 325 481 T3

Un compuesto de fórmula 11, en la que las variables son como se describen en este documento, puede prepararse por desprotección de un compuesto de fórmula 12, en la que P^1 es un grupo protector de amina



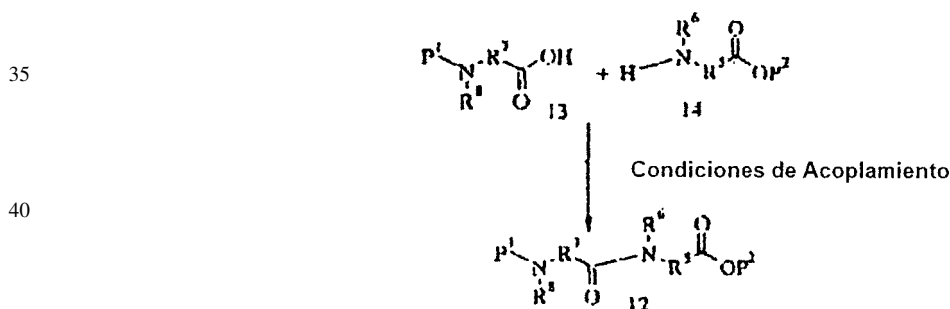
y las otras variables de la misma son como se describen en este documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector de amina, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un grupo protector de amina particular es Cbz o BOC; más particularmente Cbz. Un agente de desprotección particular es un ácido tal como HCl o $H_2/Pd(OH)_2$; más particularmente $H_2/Pd(OH)_2$. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol o un disolvente de alcanato de alquilo tal como acetato de etilo aproximadamente a la temperatura ambiente.

20

25

Un compuesto de fórmula 12, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por acoplamiento un compuesto de fórmula 13, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un compuesto de fórmula 14, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento,

30

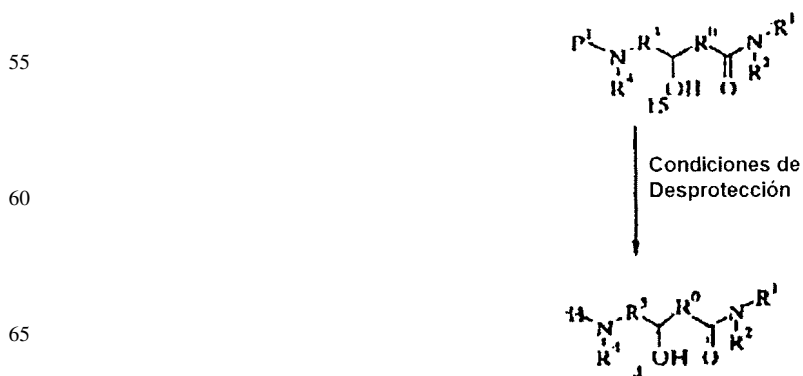


en condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan HOAt/DIC y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado tal como THF aproximadamente a la temperatura ambiente.

50

Un compuesto de fórmula 4, en la que las variables son como se describen en este documento, puede prepararse por desprotección de un compuesto de fórmula 15, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento,

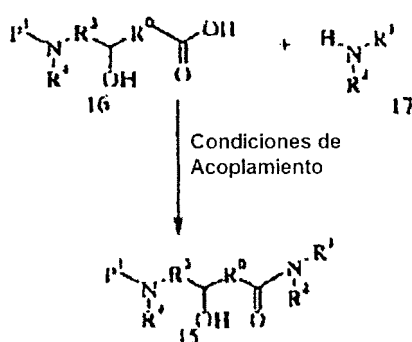
55



ES 2 325 481 T3

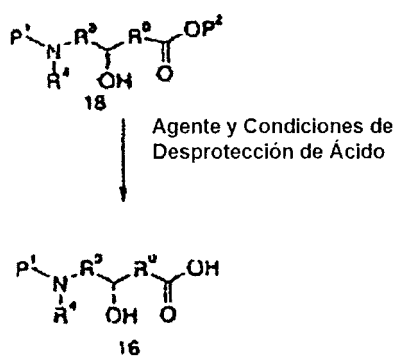
con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector de amina, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un agente protector de amina particular es Cbz o BOC; más particularmente Cbz. Un agente de desprotección particular es un ácido tal como HCl o $H_2/Pd(OH)_2$; más particularmente $H_2/Pd(OH)_2$. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol o un disolvente de alcanato de alquilo tal como acetato de etilo aproximadamente a la temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 15, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por acoplamiento un compuesto de fórmula 16, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un compuesto de fórmula 17, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento



en condiciones apropiadas. Un agente protector de amina particular es Cbz o BOC; más particularmente Cbz. Las condiciones de acoplamiento particulares usan HOBT, PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado tal como diclorometano de aproximadamente 0°C a aproximadamente la temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 16, en la que las variables son como se describen en este documento puede prepararse por desprotección de un compuesto de fórmula 18, en la que las otras variables de la misma son

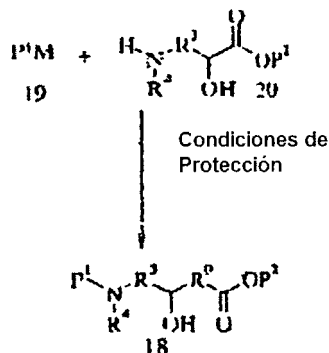


como se describen en este documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente protector de ácido, es decir, si puede retirarse (lábil) en condiciones ácidas, básicas o de hidrogenación, y de los otros restos reactivos del compuesto que experimenta la desprotección, es decir, se elige un agente de desprotección para realizar la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción simultánea. Un agente protector de amina particular es Cbz. Un agente protector de ácido particular es alquilo inferior de C_1 a C_8 ; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares incluyen realizar la desprotección en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol aproximadamente a la temperatura ambiente.

ES 2 325 481 T3

Un compuesto de fórmula 18, en la que R⁰ es un enlace y las otras variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por protección de un compuesto de fórmula 20, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un compuesto de fórmula 19, en la que

5



10

15

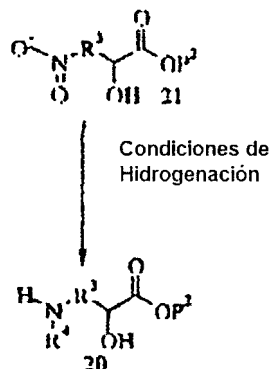
20

las variables de la misma son como se describen en este documento, en condiciones apropiadas. Un agente protector de amina particular es Cbz o BOC. Las condiciones de acoplamiento particulares usan un disolvente orgánico apropiado tal como diclorometano de aproximadamente 0°C a aproximadamente la temperatura ambiente.

25

Un compuesto de fórmula 20, en la que R⁴ es hidrógeno y las otras variables son como se describen en este documento, puede prepararse por hidrogenación de un compuesto de fórmula 21, en la que

30



35

40

45

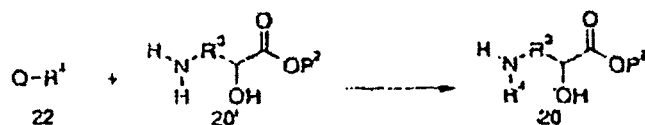
las variables de la misma son como se describen en este documento, con un agente de hidrogenación apropiado y en condiciones apropiadas. Un agente de hidrogenación particular es H₂/Pd(OH)₂. Las condiciones de hidrogenación particulares incluyen realizar la hidrogenación en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol o un disolvente de alcanoato de alquilo tal como acetato de etilo aproximadamente a la temperatura ambiente.

50

Un compuesto de fórmula 20 en la que R⁴ es un grupo alifático opcionalmente sustituido y las otras variables son como se describen en este documento puede prepararse por alquilación del compuesto 20' en el que las variables son como se describen en este documento con el compuesto 22 (agente de alquilación) en el que R⁴ es un grupo alifático opcionalmente sustituido y Q es un grupo desplazable tal como haluros, tosilatos o sulfonatos, en condiciones apropiadas.

55

60



65

Los agentes de alquilación apropiados incluyen grupos alifáticos (haluros, tosilatos o sulfonatos). Las condiciones de alquilación apropiadas incluyen realizar la alquilación en un disolvente orgánico apropiado tal como un disolvente alcohólico, por ejemplo, metanol o etanol, o un disolvente entérico, por ejemplo, éter o tetrahidrofurano de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente la temperatura de reflujo.

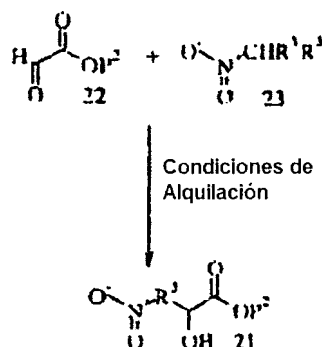
ES 2 325 481 T3

Un compuesto de fórmula 21, en la que las variables son como se describen en este documento, puede prepararse por alquilación de un compuesto de fórmula 22, en la que la variable de la misma es como se describe en este documento, con un compuesto de fórmula 23, en la que los R³ son independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido

5

10

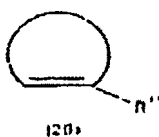
15



20 un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido como se describe en este documento, en condiciones apropiadas. Las condiciones de alquilación particulares incluyen realizar la alquilación usando una base fuerte tal como *t*-butóxido potásico en un disolvente alcohólico tal como metanol o etanol aproximadamente a la temperatura ambiente.

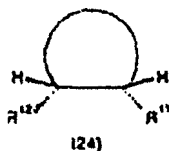
25 Un compuesto de fórmula 24 en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse realizando una adición de Michael sobre un aceptor de Michael de fórmula 29, en la que la variable de la misma es como se describe en este documento, con un derivado de glicinimida imínica.

30



35 Condiciones de Adición de Michael

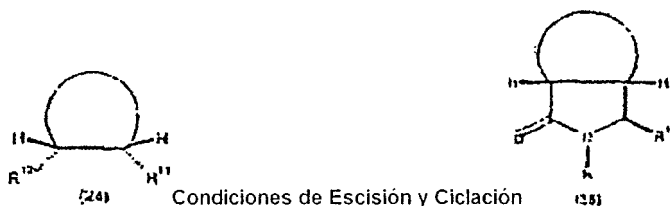
40



45 Las adiciones de Michael comprenden disolventes apróticos polares apropiados, bases de hidróxido de metal alcalino y temperaturas apropiadas. Para las adiciones de Michael, véase Corey, E.J.; Noe, M.C.; Xu, F. Tetrahedron Letter 1998, 39, 5347. Para la síntesis de catalizadores de transferencia de fase quirales, véase Corey, E.J.; Noe, M.C.; Xu, F. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 12414. Los disolventes apropiados incluyen DCM, ACN o THF dependiendo de las condiciones de reacción. Las bases apropiadas incluyen CsOH, NaOH, KOH y LiOH. Las temperaturas apropiadas varían de aproximadamente -78°C a aproximadamente 0°C, más particularmente a aproximadamente -60°C. Las glicinimidias imínicas útiles en la invención se describen en este documento. Una glicinimida imínica preferida es éster *tert*-butílico de *N*-(difenilmetileno)glicina. Además, las condiciones de adición de Michael pueden influenciarse con o sin un catalizador de transferencia de fase (PTC) (quiral y no quirales). Un PTC preferido es bromuro de *O*-[9]alil-*N*-9-antracencilmetilcinconidio.

55 Un compuesto de fórmula 25, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por escisión de imina y ciclación del compuesto de fórmula 24,

60



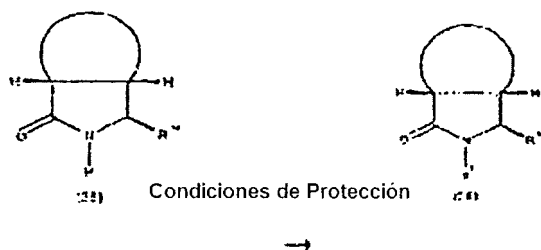
65

→

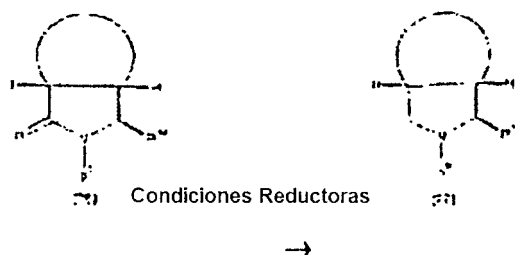
ES 2 325 481 T3

Para los procedimientos de escisión y ciclación, véase Javidan, A.; Schfer, K.; Pyne, S. Synlett 1996, 100; Tatsukawa, A.; Dan, M.; Ohbatake, M.; Kawatake, K.; Fukata, T.; Wada, E.; Kanemase, S.; Kakei, S. J. Org. Chem. 1993, 58, 4221. Las condiciones de escisión y ciclación incluyen el uso de disolventes polares, reactivos ácidos y temperaturas de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 150°C. Las condiciones preferidas incluyen el uso de EtOH, AcONa y NH₂OH·HCl, y una temperatura de aproximadamente el punto de ebullición para el disolvente usado.

Un compuesto de fórmula 26, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por protección de la amida del compuesto de fórmula 25, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, con un grupo protector de amida adecuado tal como BOC. Otros grupos protectores adecuados incluyen CBz, -CO₂alquilo. Véase también Greene, T.W.; P.G.M. en Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, 1991 para otros grupos protectores de amina. Las condiciones de protección incluyen el uso de disolventes apróticos polares, bases orgánicas como catalizadores, y temperaturas de aproximadamente 0°C-100°C. Las condiciones preferidas incluyen el uso de ACN, dimetil amino piridina y una temperatura de aproximadamente la temperatura ambiente.



Un compuesto de fórmula 27, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por reducción del compuesto protegido de fórmula 26, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento.



De hecho, se realizan dos reducciones. La primera reducción es de la amida para dar el hemiaminal usando DIBALH o superhidruro [LiBEtH]. La segunda reducción es del hemiaminal para dar la amina usando Et₃SiH y BF₃·OEt₂. Véase Collado, I; Ezquerro, J.; Mateo, A.I.; Rubio, A., J. Org. Chem. 1998, 63 1995-2001 y Ezqueera, J.; P-edregal, C.; Yrurettagoyena, B.; Rubio, A.; Carreno, M.C.; Escribano, A.; Garcia Ruano, J.L. J. Org. Chem. 1995, 60, 2925 para las condiciones reductoras. Otras condiciones habituales para convertir piroglutamatos en pirrolidinas son el uso de BH₃·SMe₂.

Un compuesto de fórmula 28, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento, puede prepararse por desprotección del compuesto de fórmula 27, en la que las variables de la misma son como se describen en este documento.



Véase Gibson, F.G.; Bermeier, S.C.; Rapoport, H., J. Org. Chem. 1994, 59, 3216-3218 para las condiciones de retirada selectiva del grupo protector de N-BOC en presencia de éster *tert*-butílico. Un especialista en la técnica conocerá qué condiciones de desprotección dependerán de la elección del grupo protector. Por ejemplos, si se usa CBz, pueden usarse condiciones básicas o de hidrogenación. Preferiblemente, se usa BOC, puede usarse HCl 1 N en acetato de etilo. Véase Greene, T.W.; P.G.M. en Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, 1991.

ES 2 325 481 T3

La persona especialista en la técnica apreciará que un compuesto de fórmula 3 puede prepararse por acoplamiento un compuesto de fórmula 5 con un compuesto de fórmula 28 en las condiciones descritas anteriormente en este documento.

5 Los procedimientos para preparar R^3 , R^5 o R^7 como restos etandiilo opcionalmente sustituido incluyen los conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, los procedimientos descritos "The organic Chemistry of β -Lactams" editado por G. Georg, VCH Publishers, Inc. (1993). por ejemplo, páginas 240-241 y 303-20 305.

10 Los esquemas 1-11 que se muestran a continuación ejemplifican procedimientos proporcionados para preparar un azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido. Los procedimientos de los siguientes esquemas también pueden aplicarse a otros azaheterociclilos multicíclicos opcionalmente sustituidos que comprenden sustituyentes compatibles del mismo tipo.

15

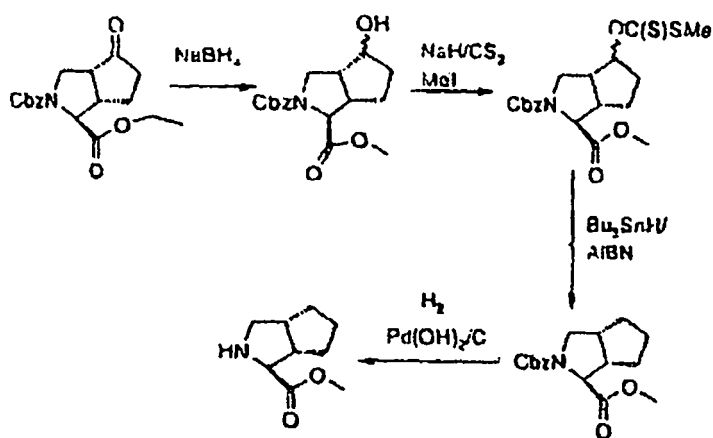
Esquema 1

20

25

30

35



40

Esquema 2

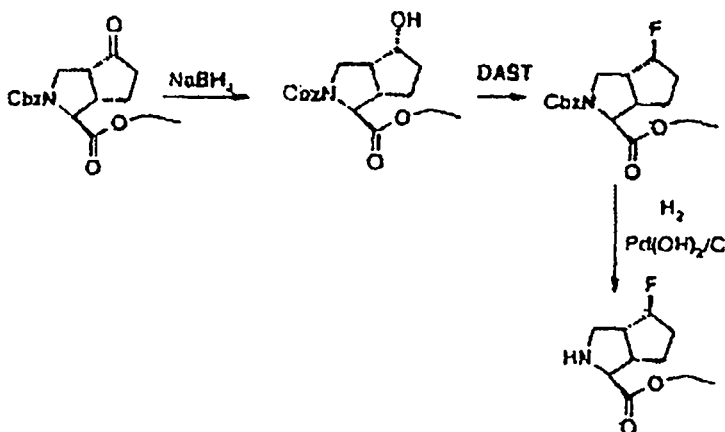
45

50

55

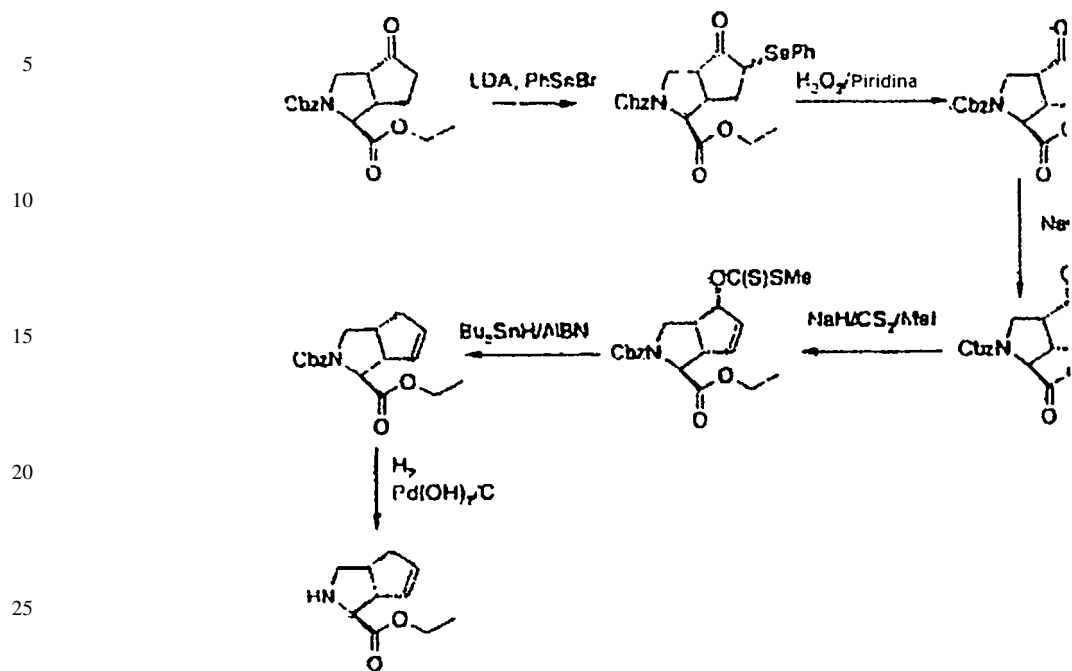
60

65

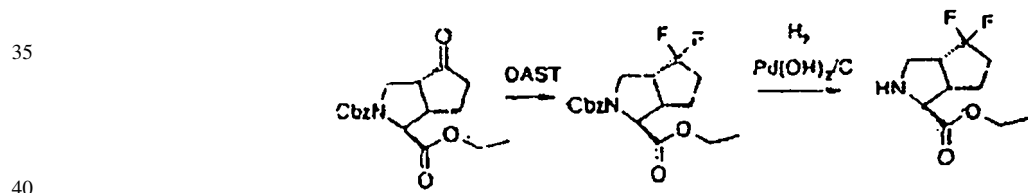


ES 2 325 481 T3

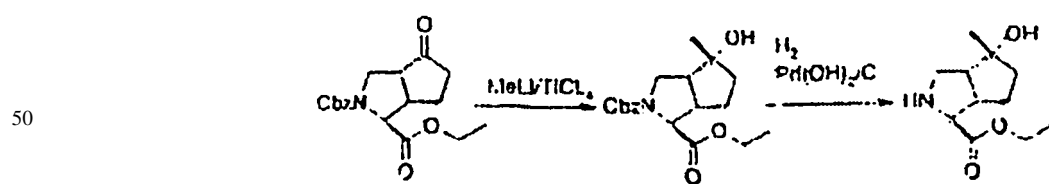
Esquema 3



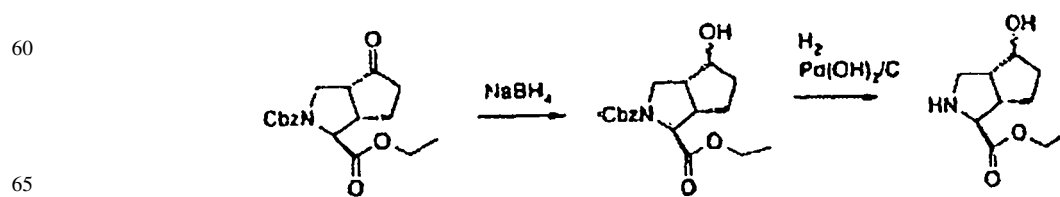
Esquema 4



Esquema 5

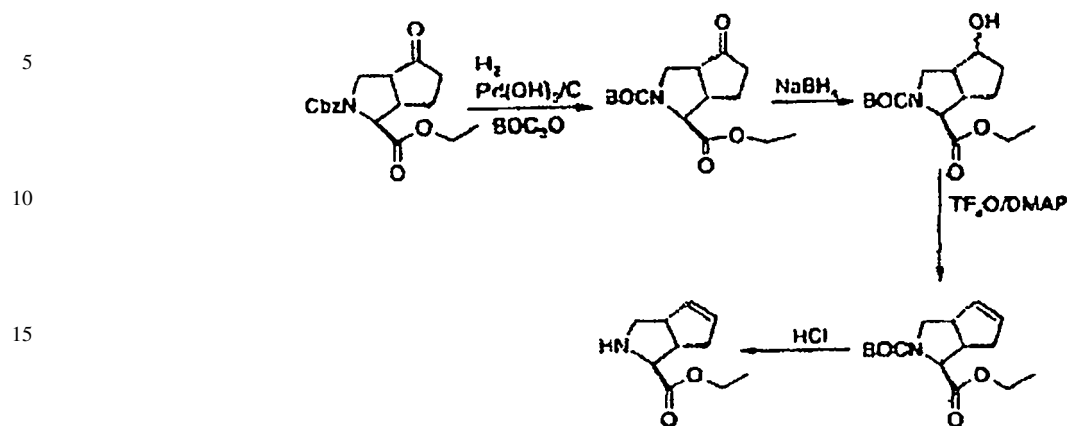


Esquema 6

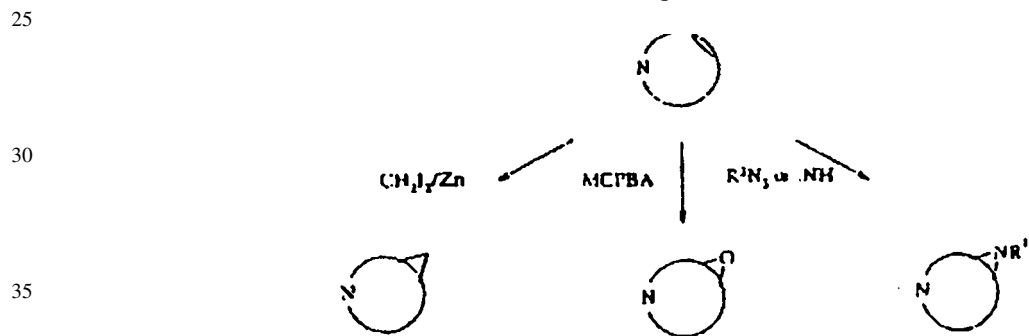


ES 2 325 481 T3

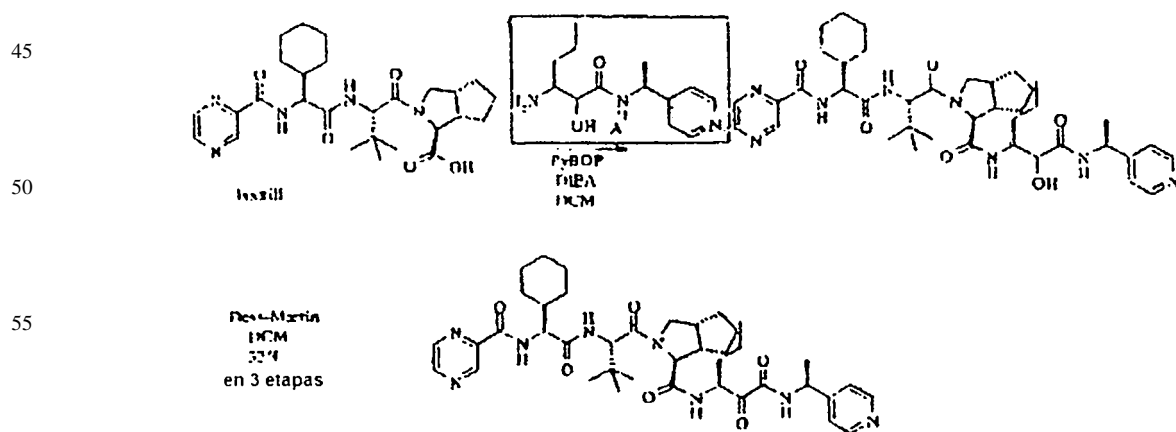
Esquema 7



Esquema 8

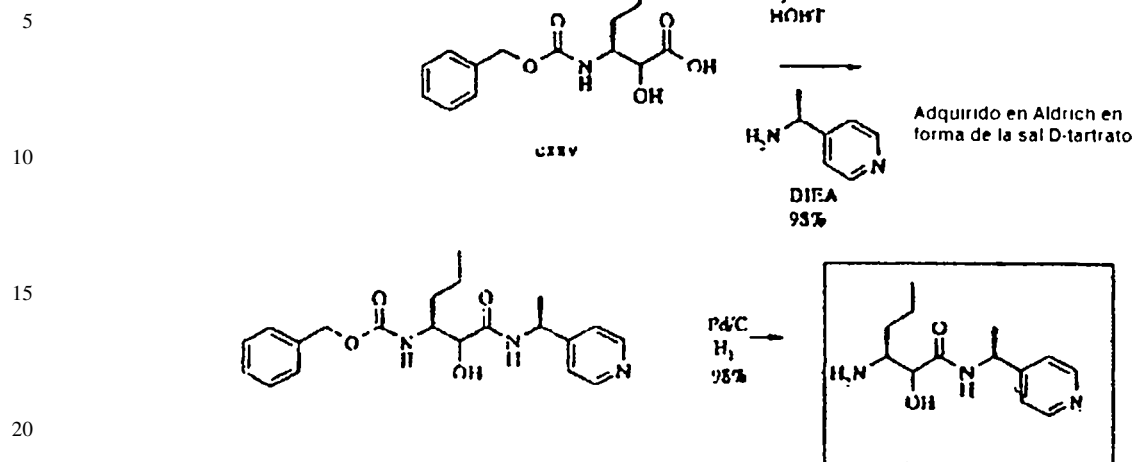


Esquema 9

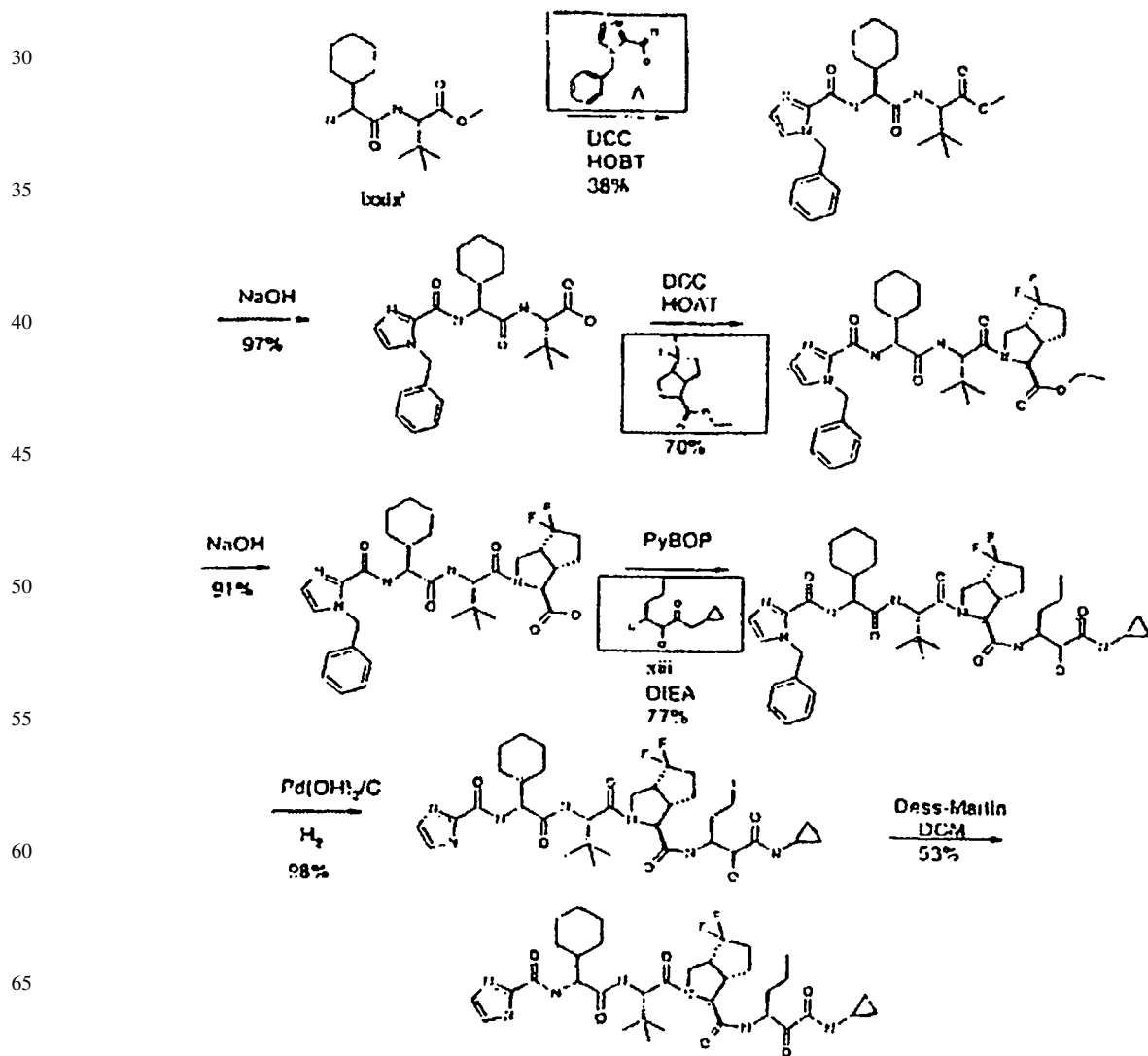


ES 2 325 481 T3

Esquema 10



Esquema 11



ES 2 325 481 T3

Un compuesto de fórmula I que incluye un grupo que contiene uno o más átomos de nitrógeno en el anillo, preferiblemente imina (=N-), puede convertirse en el compuesto correspondiente en el que uno o más átomos de nitrógeno del anillo del grupo se oxidan para dar un N-óxido, preferiblemente por reacción con un perácido, por ejemplo ácido peracético en ácido acético o ácido *m*-cloroperoxibenzoico en un disolvente inerte tal como diclorometano, a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente a la temperatura de reflujo, preferiblemente a temperatura elevada.

En las reacciones que se describen a continuación en este documento, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, donde éstos se desean en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, para ejemplos, véase T.W. Green y P.G.M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley y Sons (1991); J.F. W. McOmie en "Protective Groups in Organic Chemistry" Plenum Press, 1973.

Un compuesto que se prepara como se describe en este documento puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse mediante retirada por destilación del disolvente a partir de la mezcla de reacción o, si es necesario, después de la retirada por destilación del disolvente a partir de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y retirando por destilación el disolvente del extracto. Además, si se desea, el producto puede purificarse adicionalmente por diversas técnicas, tales como recristalización, reprecipitación o diversas técnicas cromatográficas, concretamente cromatografía en columna o cromatografía preparativa de capa fina.

De acuerdo con una característica adicional de la presente invención, los compuestos de la invención pueden prepararse por interconversión de otros compuestos de la invención.

Como un ejemplo del procedimiento de interconversión, los compuestos de fórmula I que contienen enlaces sulfóxido pueden prepararse por oxidación de los compuestos correspondientes que contienen enlaces S. Por ejemplo, la oxidación puede realizarse convenientemente por medio de reacción con un peroxiacido, por ejemplo, ácido 3-cloroperbenzoico, preferiblemente en un disolvente inerte, por ejemplo, diclorometano, preferiblemente a o casi a la temperatura ambiente, o como alternativa por medio de hidrogenoperoxomonosulfato potásico en un medio tal como metanol acuoso, tamponado a aproximadamente pH 5, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0°C y la temperatura ambiente. Este último procedimiento se realiza para compuestos que contienen un grupo lábil a ácidos.

Como otro ejemplo del procedimiento de interconversión, los compuestos de fórmula I que contienen enlaces sulfona pueden prepararse por oxidación de compuestos correspondientes que contienen enlaces -S- o sulfóxido. Por ejemplo, la oxidación puede realizarse convenientemente por medio de reacción con un peroxiacido, por ejemplo, ácido 3-cloroperbenzoico, preferiblemente en un disolvente inerte, por ejemplo, diclorometano, preferiblemente a o casi a la temperatura ambiente.

Se entenderá que la designación de la aromaticidad con respecto a arilos y heteroarilos en este documento incluye cualquier estructura de anillos insaturados muy resonante. Como alternativa, la situación de los dobles enlaces, cuando se indica, representa una estructura potencial para el compuesto representado pero se entenderá que incluye otros estados resonantes del compuesto así como especies protonadas y cargadas, aunque sólo puede representarse una de ellas.

Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener centros asimétricos. Estos centros asimétricos pueden estar independientemente en la configuración R o S. Será evidente para los especialistas en la técnica que ciertos compuestos de la invención también pueden mostrar isomería geométrica. Debe apreciarse que la presente invención incluye isómeros geométricos y estereoisómeros individuales y mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, de compuestos de acuerdo con la invención. Dichos isómeros pueden separarse de sus mezclas, por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos, por ejemplo técnicas cromatográficas y técnicas de recristalización, o se preparan por separado a partir de los isómeros apropiados de sus intermedios.

Para el propósito de este documento, se entiende que las formas tautoméricas se incluyen en la indicación de un grupo dado, por ejemplo, tio/mercapto o oxo/hidroxilo.

Las sales de adición de ácidos se forman con los compuestos de la invención en los que está presente una función básica tal como un grupo amino, alquilamino o dialquilamino. Se prefieren sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, es decir, no tóxicas. Las sales elegidas se seleccionan óptimamente para que sean compatibles con los vehículos farmacéuticos habituales y se adaptan para la administración oral o parenteral. Pueden prepararse sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención por reacción de la base libre con el ácido apropiado, por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención puede prepararse disolviendo la base libre en agua o en una solución alcohólica acuosa u otros disolventes adecuados que contienen el ácido apropiado y aislando la sal por evaporación de la solución, o haciendo reaccionar la base libre y el ácido en un disolvente orgánico, en cuyo caso la sal se separa directamente o puede obtenerse por concentración de la solución. Algunos ácidos adecuados para el uso en la preparación de dichas sales son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, diversos ácidos carboxílicos y sulfónicos orgánicos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido tartárico.

co, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácidos grasos, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, ciclopentanopropionato, diglucanato, dodecilsulfato, bisulfato, butirato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, yodhidrato, 3-hidroxi-etanosulfonato, glicerofosfato, picrato, pivalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, tiocianato, 2-naftalenosulfonato, undecanoato, nicotinato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, canforato, canforsulfonato, y otros.

Las sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención pueden regenerarse a partir de las sales por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos. Por ejemplo, los compuestos de partida de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de ácidos por tratamiento con un álcali, por ejemplo, solución acuosa de bicarbonato sódico o solución acuosa de amoniaco.

Los compuestos de la presente invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de bases por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos. Por ejemplo, compuestos de partida de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de bases por tratamiento con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico.

Pueden formarse sales de adición de bases cuando el compuesto de la invención contiene un grupo carboxi, o un bioisómero suficientemente ácido. Las bases que pueden usarse para preparar las sales de adición de bases incluyen preferiblemente las que producen, cuando se combinan con el ácido libre, sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales cuyos cationes no son tóxicos para el paciente a dosis farmacéuticas de las sales, de manera que los efectos inhibidores beneficiosos inherentes a la base libre no se vean afectados negativamente por los efectos secundarios atribuibles a los cationes. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las obtenidas a partir de sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, dentro del alcance de la invención, incluyen las obtenidas a partir de las siguientes bases: hidruro sódico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de cinc, amoniaco, etilendiamina, N-metil-glucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilaminonio y similares.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse convenientemente, o formarse durante el procedimiento de la invención, en forma de solvatos (por ejemplo, hidratos). Los hidratos de los compuestos de la presente invención pueden prepararse convenientemente por recristalización en una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos, usando disolventes orgánicos tales como dioxano, tetrahidrofurano o metanol.

Los materiales de partida e intermedios pueden prepararse por aplicación o adaptación de procedimientos conocidos, por ejemplo procedimientos como los descritos en los Ejemplos de Referencia o sus equivalentes químicos obvios.

Los compuestos de la invención, sus procedimientos de preparación y su actividad biológica se verán más claramente a partir del examen de los siguientes ejemplos que se presentan únicamente como una ilustración y no deben considerarse como limitación del ámbito de la invención.

Las muestras se analizaron por TLC, RMN, RP-HPLC o AE.

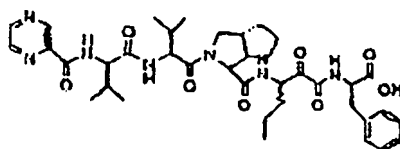
Los compuestos de la invención, sus procedimientos de preparación y su actividad biológica se verán más claramente a partir del examen de los siguientes ejemplos que se presentan únicamente como una ilustración y no deben considerarse como limitación del ámbito de la invención.

Las muestras se analizaron por TLC, RMN, RP-HPLC o AE.

Ejemplo I

Compuestos de comparación A-E

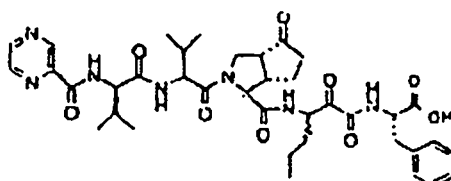
A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xi (310 mg, 0,39 mmol) se le añade TFA (4 ml). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 5 horas. En este momento, el disolvente se retira al vacío. El residuo resultante se purifica por HPLC de fase inversa para dar 195 mg (68%) del compuesto A.



ES 2 325 481 T3

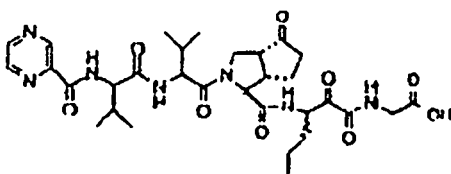
Seguindo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos B-E:

5



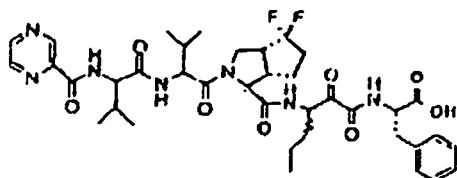
10

15

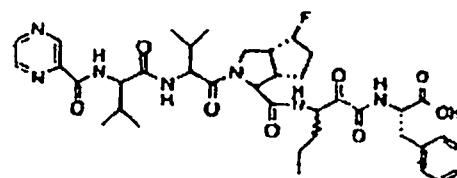


20

25



30

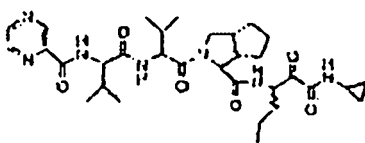


Ejemplo 2

35 *Compuestos de comparación F-M*

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xii (350 mg, 0,56 mmol) se le añade reactivo de DMP (307 mg, 0,73 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 30 minutos. Después, la mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml) y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80-90%/Hexanos), dando 248 mg (71%) del compuesto F

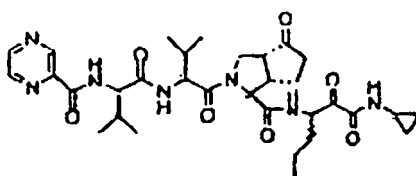
45



50

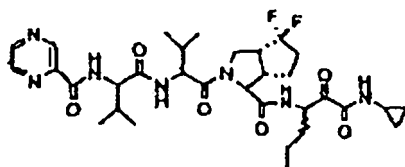
Seguindo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos G-M:

55

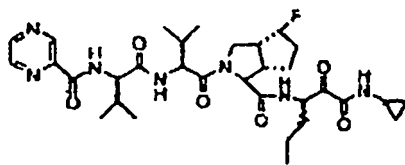


60

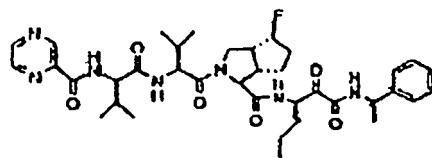
65



5

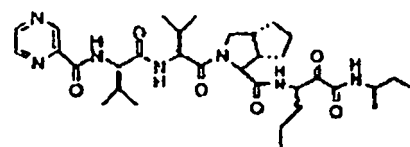


10

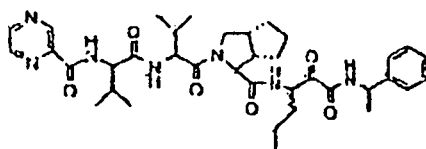


15

20

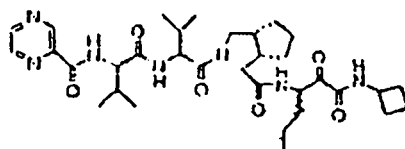


25



30

35



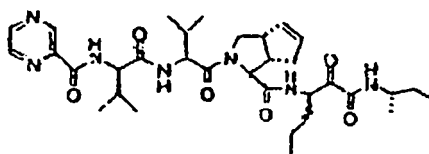
40

Ejemplo 3

45 *Compuestos de comparación N-R*

A una solución en DCM (4 ml) del compuesto xix (-0,22 mmol) se le añade reactivo de DMP (146 mg, 0,34 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se interrumpe con Na_2SO_3 al 10%. Después, la mezcla de reacción se diluye con DCM. La fase orgánica se separa y se lava dos veces con Na_2SO_3 al 10% y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, dando un residuo, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), proporcionando 78 mg (56%) del compuesto deseado N

55



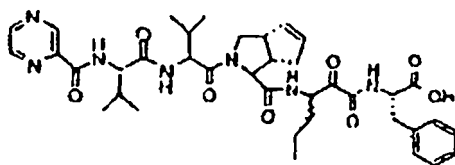
60

65

ES 2 325 481 T3

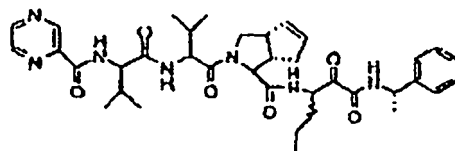
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos O-R:

5



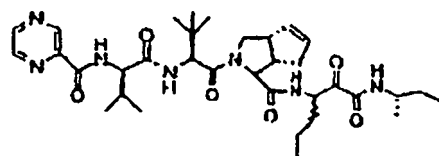
10

15

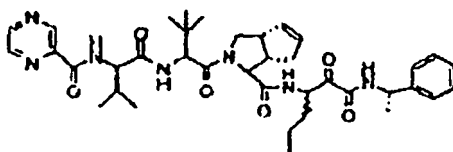


20

25



30



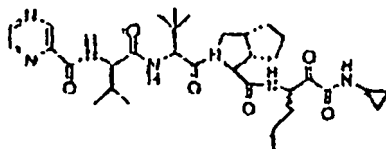
35

40 Ejemplo 4

Compuestos de comparación S-W

45 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxv (320 mg, 0,5 mmol) se le añade reactivo de DMP (272 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/Hexanos), dando 170 mg (53%) del compuesto S.

50



55

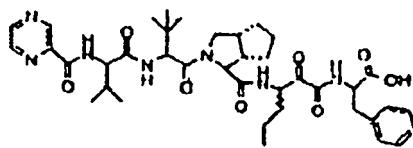
60

65

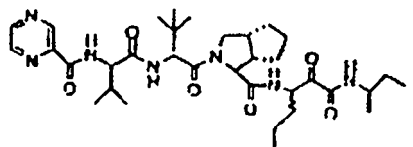
ES 2 325 481 T3

Seguendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos T-W:

5

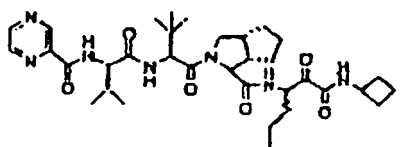


10



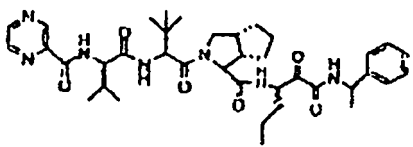
15

20



25

30



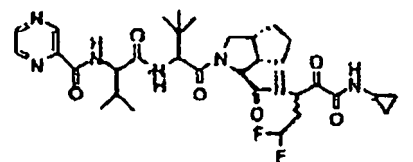
35

40 Ejemplo 5

Compuestos de comparación X-AD

45 A una solución en DCM (20 ml) del compuesto xxvi (400 mg, 0,6 mmol) se le añade reactivo de DMP (329 mg, 0,78 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1,5 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70-100%/Hexanos), dando 210 mg (53%) del compuesto X.

50



55

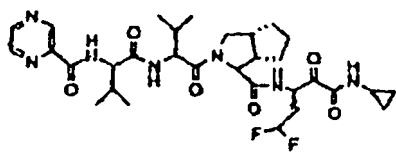
60

65

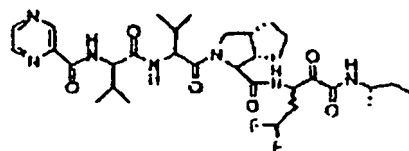
ES 2 325 481 T3

Seguindo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos Y-AD:

5

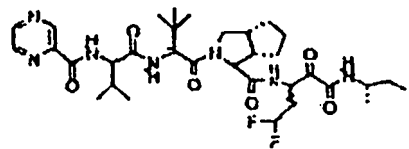


10



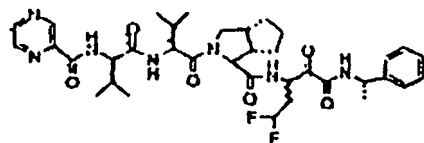
15

20



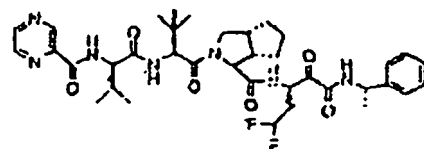
25

30

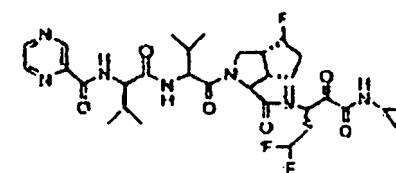


35

40



45



50

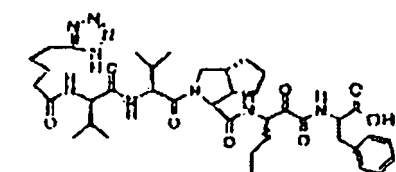
Ejemplo 6

55

Compuestos de comparación AE-A1

El compuesto xxxiii (150 mg; 0,76 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y se agita durante dos días. El producto se purifica por RP-HPLC para producir 40 mg (33% de rendimiento) del compuesto AE.

60

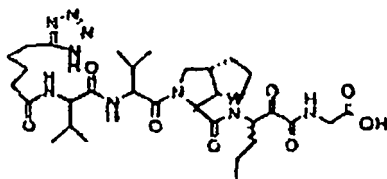


65

ES 2 325 481 T3

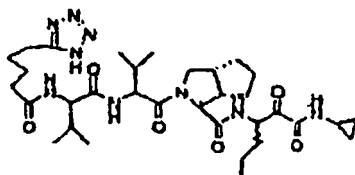
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos AF-AI:

5



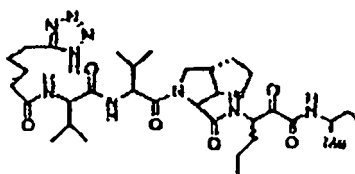
10

15



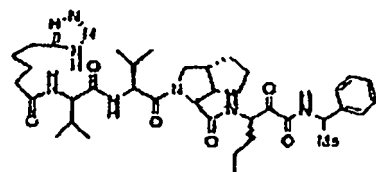
20

25



30

35



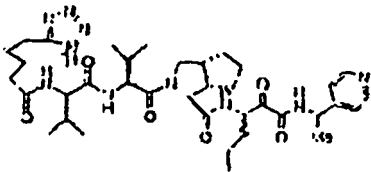
Ejemplo 7

40

Compuesto de comparación AJ

El compuesto xxxviii (180 mg, 0,21 mmol) se disuelve en TFA puro (5 ml) y se deja durante 3 días aproximadamente a la temperatura ambiente. En este momento, la mezcla de reacción se concentra al vacío, dando un residuo, que se purifica por HPLC de fase inversa, dando 50 mg (32%) del compuesto AJ,

45



50

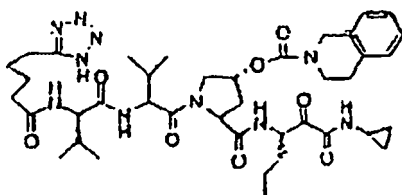
Ejemplo 8

55

Compuestos de comparación AK-AM

El compuesto xxxxiii (150 mg; 0,16 mmol) se disuelve en 4,5 ml de TFA y se agita durante tres días. El producto se purifica por RP-HPLC para producir 70 mg (54% de rendimiento) del compuesto AK,

60

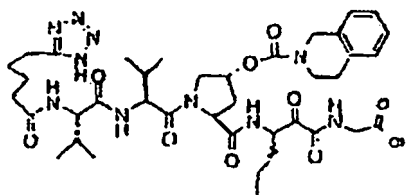


65

ES 2 325 481 T3

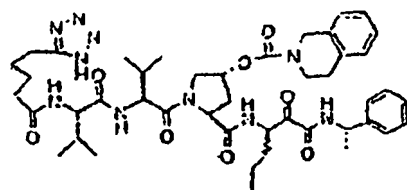
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos AL-AM:

5



10

15



20

25

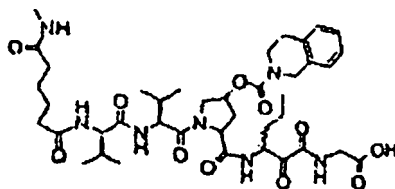
Ejemplo 9

Compuestos de comparación AN

30

El compuesto lii (80 mg) se disuelve en 3 ml de TFA y 3 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se retira por evaporación. El residuo resultante se purifica por HPLC, produciendo 62 mg (83%) del compuesto AN.

35



40

45

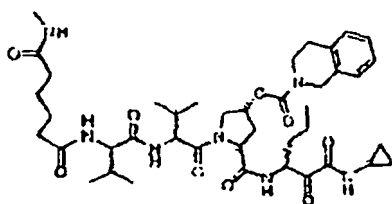
Ejemplo 10

Compuestos de comparación AO

50

El compuesto liii (160 mg; 0,2 mmol) se disuelve en 5 ml de DCM y se añade reactivo de DMP (170 mg; 0,4 mmol). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante tres horas. El disolvente se retira por evaporación y el residuo se disuelve en acetonitrilo al 50%/agua y se purifica por RP-HPLC, produciendo 51 mg (32%) del compuesto AO,

55



60

65

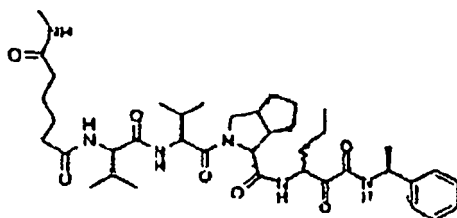
ES 2 325 481 T3

Ejemplo 11

Compuestos de comparación AP

- 5 El compuesto lix (162 mg; 0,22 mmol) se disuelve en 8 ml de DCM y se añade reactivo de DMP (189 mg; 0,44 mmol). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación y el producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 41 mg (25%) del compuesto AP,

10



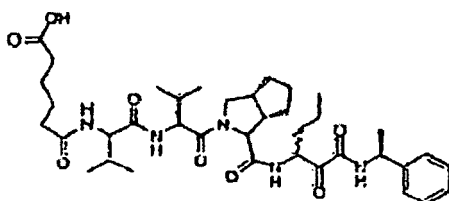
15

Ejemplo 12

20 Compuestos de comparación AQ

- 25 El compuesto lx (70 mg; 0,09 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y 5 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira al vacío y el residuo se disuelve en acetonitrilo al 50%/agua y se liofiliza, produciendo el compuesto AQ en forma de un polvo,

30

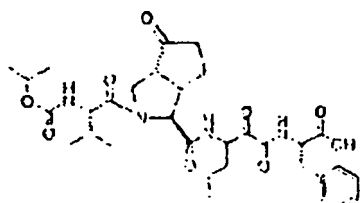


35 Ejemplo 13

Compuestos de comparación AR-BG

- 40 El compuesto lxvi (223 mg, 0,326 mmol) se agita en una solución de TFA (5 ml) y DCM (5 ml) durante 4 horas. El análisis por TLC (gel de sílice: MeOH al 2%/EtOAc) muestra la completa conversión en el producto más lento. El disolvente se retira a presión reducida y el producto se liofiliza, dando 198 mg (97%) del compuesto AR.

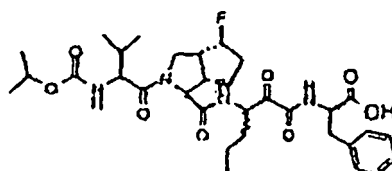
45



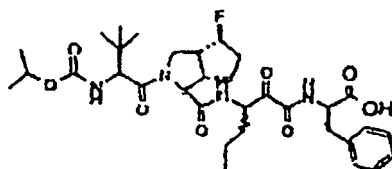
50

55 Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos AS-BG:

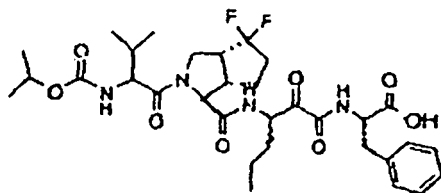
60



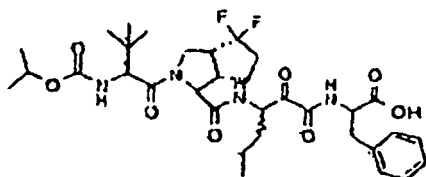
65



5



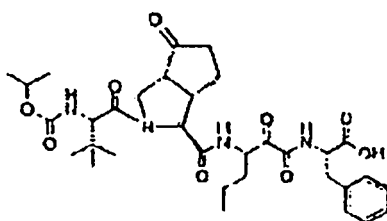
10



15

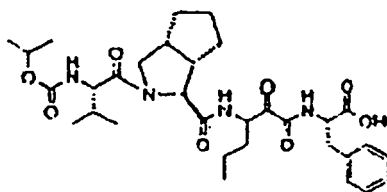
20

25



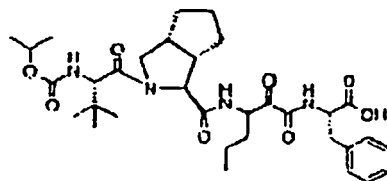
30

35



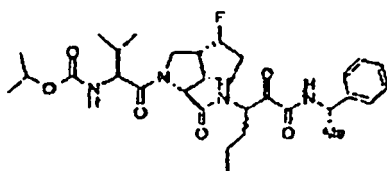
40

45



50

55

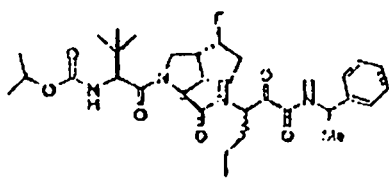


60

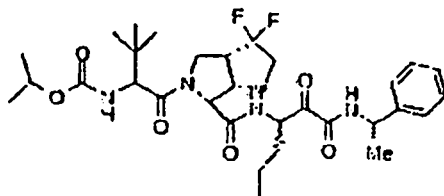
65

ES 2 325 481 T3

5

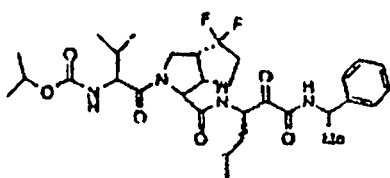


10



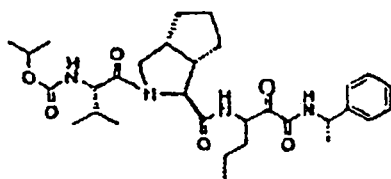
15

20



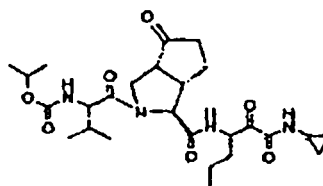
25

30



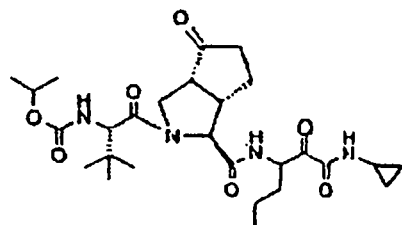
35

40



45

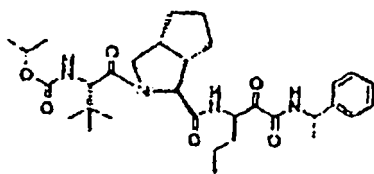
50



55

60

65



5

10

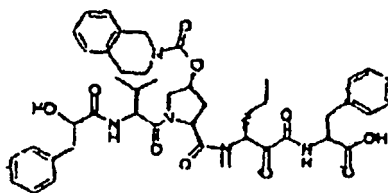
Ejemplo 14

Compuestos de comparación BH-BS

15

El compuesto lxxiii (150 mg, 0,15 mmol) se recoge en DCM (3 ml). A esta solución se le añade TFA (1,5 ml). La solución resultante se agita durante una noche. En este momento, la reacción se concentra al vacío, dando un residuo. El residuo se purifica por HPLC de fase inversa y se liofiliza, dando 60 mg (50%) del compuesto BH,

20

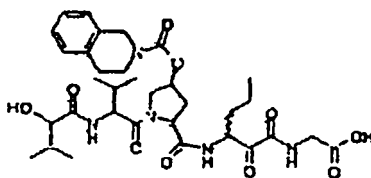


25

30

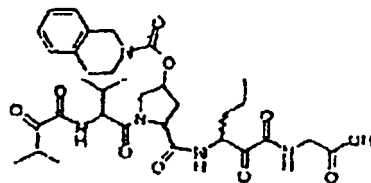
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos BI-BS:

35



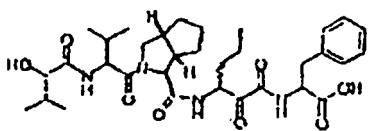
40

45



50

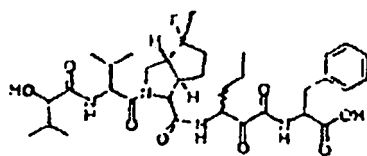
55



60

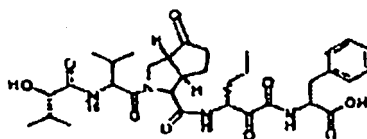
65

5



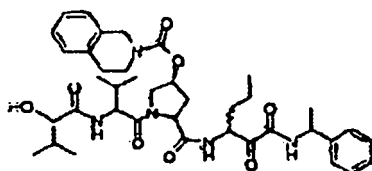
10

15



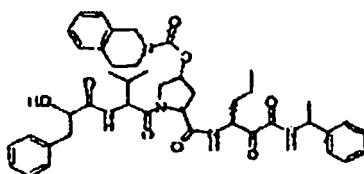
20

25



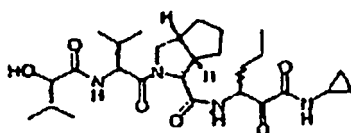
30

35

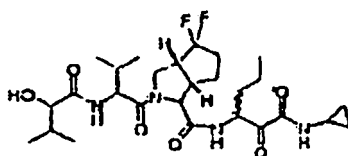


40

45

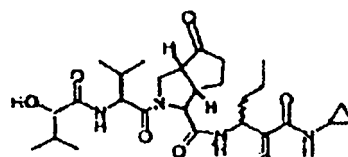


50

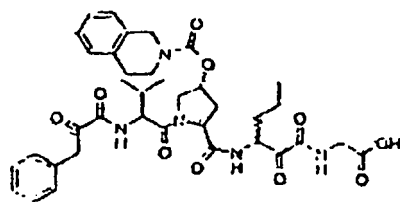


55

60



65



5

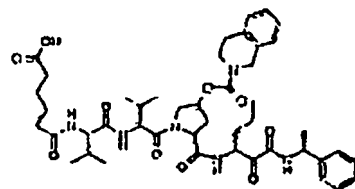
10

Ejemplo 15

15 *Compuestos de comparación BT-BU*

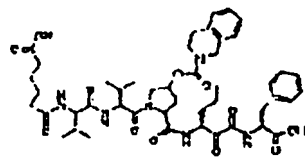
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12 y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos BT-BU:

20



25

30



35

40

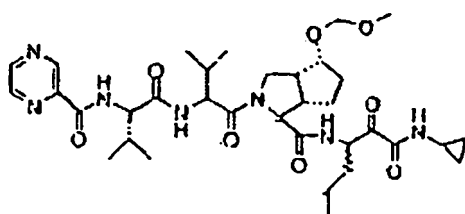
Ejemplo 16

Compuesto de comparación BV

45

A una solución en diclorometano (4,2 ml) del compuesto lxxvii (143 mg, 0,21 mmol) se le añade reactivo de DMP (165 mg, 0,39 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 y se concentra para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 124 mg (79%) del compuesto BV.

50



55

60

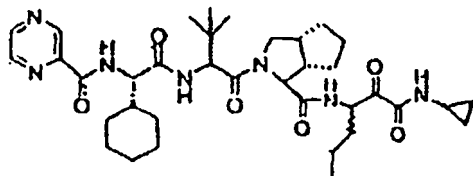
65

Ejemplo 17

Compuesto BW y compuestos de comparación BX-CA

5 A una solución en diclorometano (20 ml) del compuesto lxxxix (420 mg, 0,62 mmol) se le añade reactivo de DMP (342 mg, 0,81 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1 hora y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/Hexanos), dando 208 mg (50%) del compuesto BW,

10

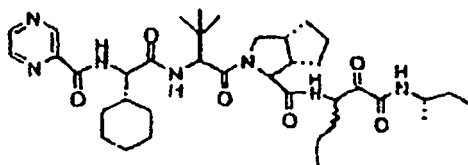


15

20

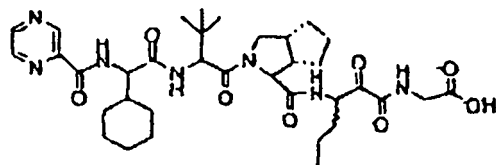
Si siguiendo el procedimiento anterior pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos BX-CA:

25



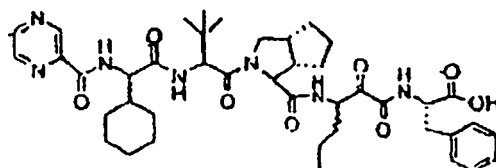
30

35



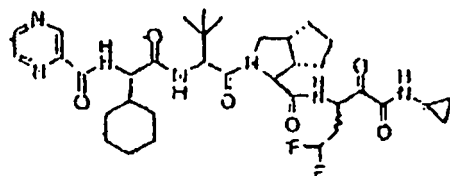
40

45



50

55



60

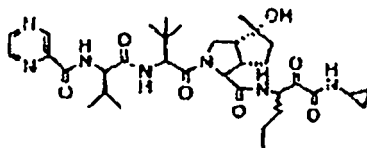
65

Ejemplo 18

Compuestos de comparación CB-CC

5 A una solución en diclorometano (6,5 ml) del compuesto lxxxvii (200 mg, 0,3 mmol) se le añade reactivo de DMP (227 mg, 0,54 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 138 mg (70%) del compuesto CB,

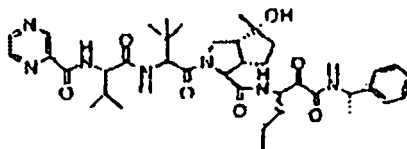
10



15

20 Siguiendo el procedimiento anterior pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CC:

25



30

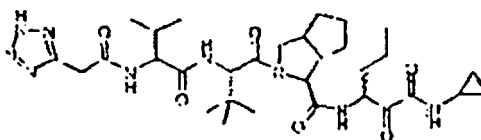
Ejemplo 19

Compuesto de comparación CD

35

El compuesto lxxxviii (40 mg, 0,05 mmol) se recoge en TFA (3 ml). La solución se agita durante dos noches y se concentra. El residuo se purifica por HPLC de fase inversa, dando 25 mg (74%) del compuesto CD.

40



45

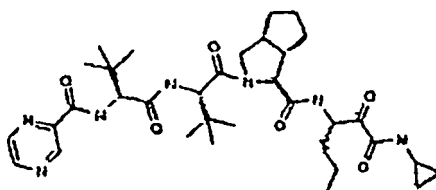
Ejemplo 20

Compuesto de comparación CE

50

55 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 17 y usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CE:

55



60

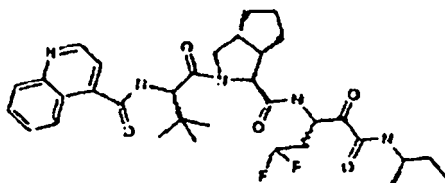
65

Ejemplo 21

Compuestos de comparación CF-CG

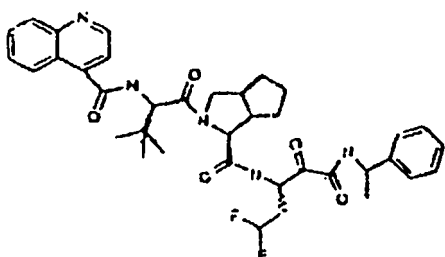
5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 14 y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes ejemplos consecutivos CF-CG:

10



15

20



25

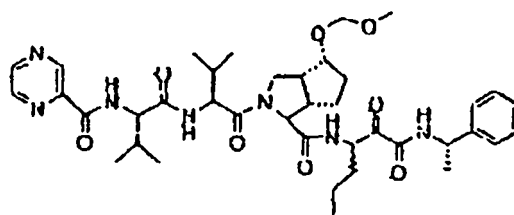
30

Ejemplo 22

Compuesto de comparación CH

35 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 16 y usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CH:

40



45

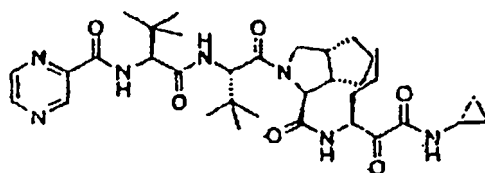
50 Ejemplo 23

Compuestos de comparación CI-CM

55 El compuesto cxi (490 mg, 0,75 mmol) se disuelve en DCM (6 ml). A esta solución se le añade reactivo de DMP (380 mg, 0,9 mmol) y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con una solución al 10% de Na₂SO₃, y después la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 70%/hexanos, produciendo el compuesto CI (325 mg, 66,4%).

60

65



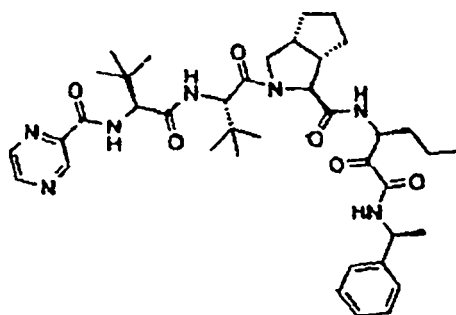
ES 2 325 481 T3

Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CJ-CM:

5

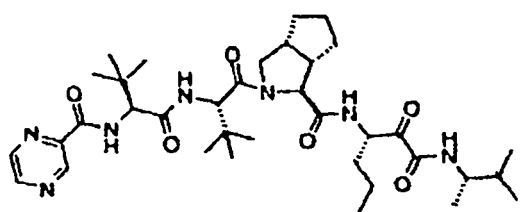
10

15



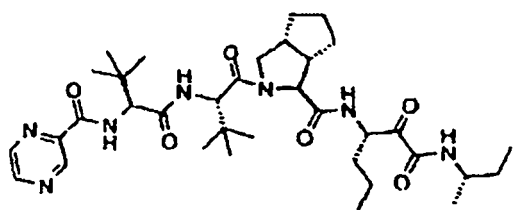
20

25



30

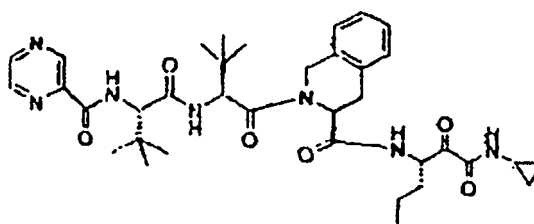
35



40

y

45



50

Ejemplo 24

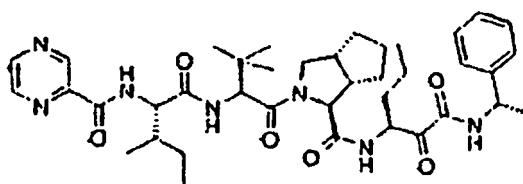
Compuestos de comparación CN

55

A una solución en DCM/THF (3 ml/3 ml) del compuesto exviii (335 mg, 0,46 mmol) se le añade reactivo de DMP (300 mg, 0,69 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos) produce el compuesto CN (220 mg, 67%).

60

65



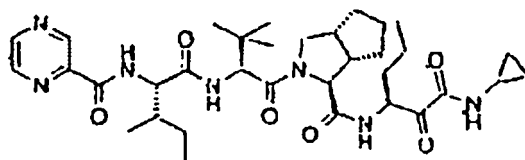
ES 2 325 481 T3

Ejemplo 25

Compuestos de comparación CO-CR

5 A una solución en DCM/THF (1,5 ml/1,5 ml) del compuesto cxix (164 mg, 0,25 mmol) se le añade reactivo de DMP (159 mg, 0,38 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, dando un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos) produce el compuesto CO (100 mg, 61%).

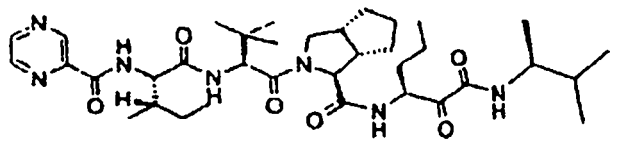
10



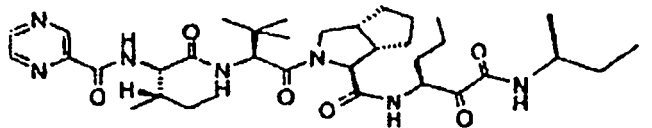
15

20 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados se preparan los siguientes compuestos consecutivos CP-CR:

25



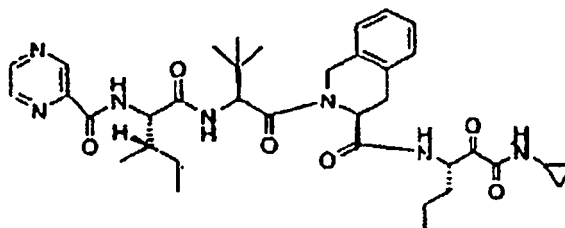
30



35

y

40



45

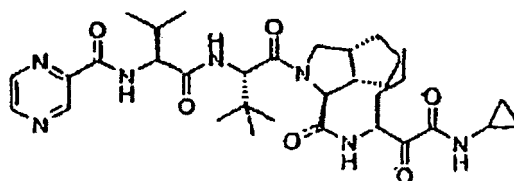
50

Ejemplo 26

Compuestos de comparación CS-CT

55 El compuesto cxx se disuelve en DCM (3 ml), a la solución se le añade reactivo de DMP (180 mg, 0,41 mmol) y después se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na₂SO₃ al 10% y después la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica cromatográficamente con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto CS (95 mg, 43,7%).

60

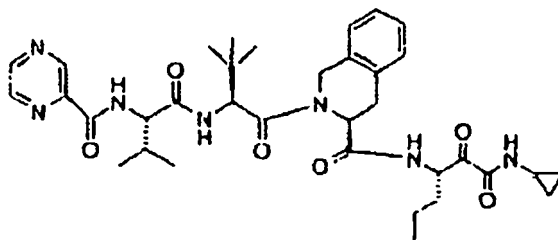


65

ES 2 325 481 T3

Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando el material de partida apropiado, se prepara el siguiente compuesto CT:

5



10

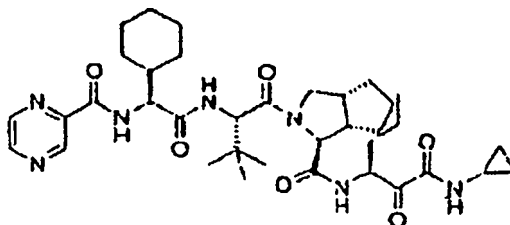
Ejemplo 27

15

Compuesto CU y compuestos de comparación EI, EK-EM, EO-EZ y FA-FG

El compuesto cxxviii (356 mg, 0,52 mmol) se disuelve en DCM (5 ml), a esta solución se le añade reactivo de DMP (270 mg, 0,63 mmol) y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na₂SO₃ al 10% y después la fase orgánica se separa y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración del disolvente orgánico, el residuo se purifica cromatográficamente con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto CU (200 mg, 56,3%), p.f. 225-235°C.

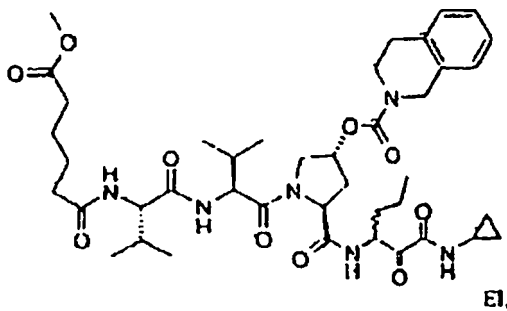
25



30

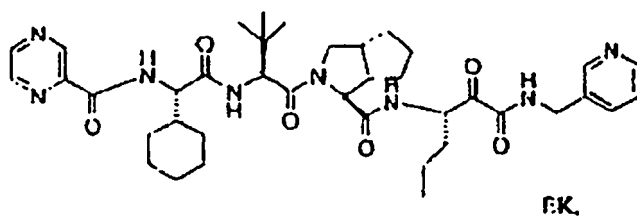
Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos EI, EK-EM, EO-EZ y FA-FH:

35



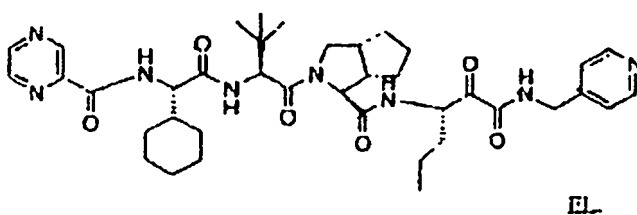
40

45



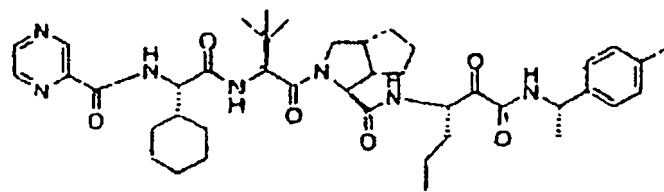
50

55

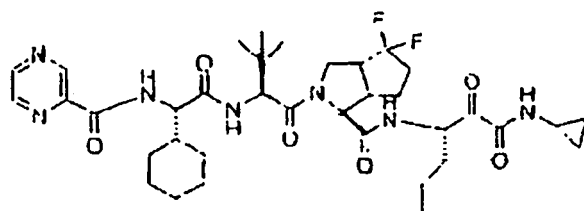


60

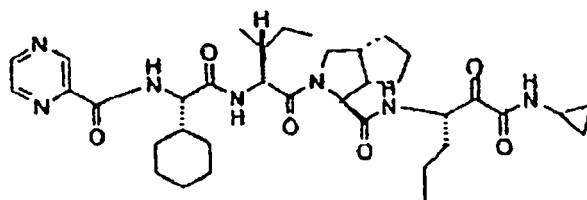
65



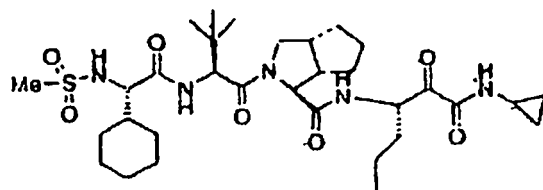
EM.



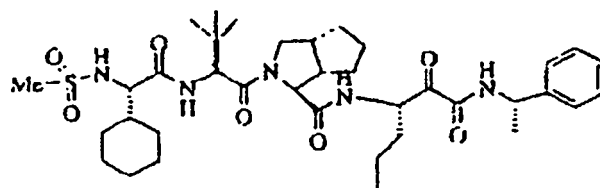
EQ.



EP.

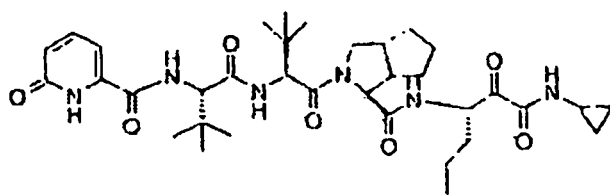


EQ.



ER.

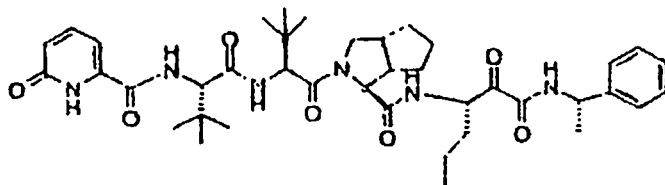
5



F.S.

10

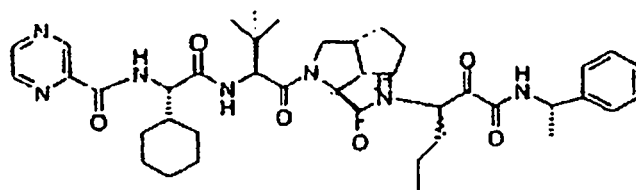
15



F.T.

25

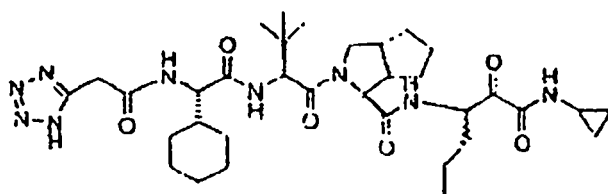
30



F.U.

40

45

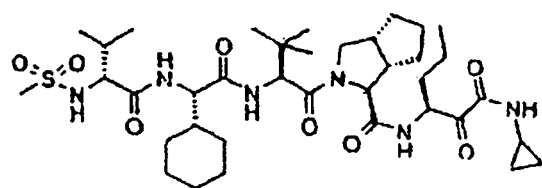


F.V.

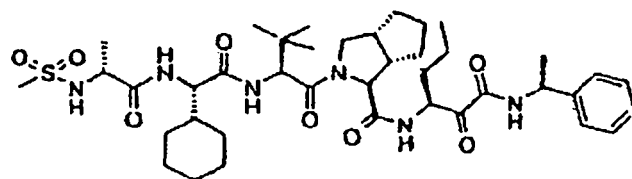
55

60

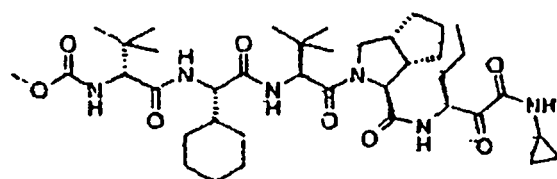
65



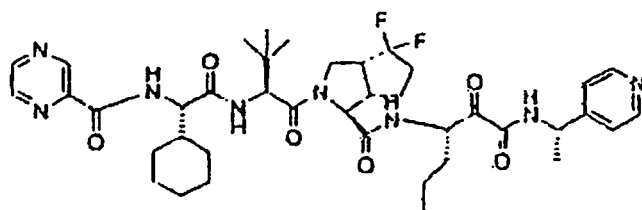
EW.



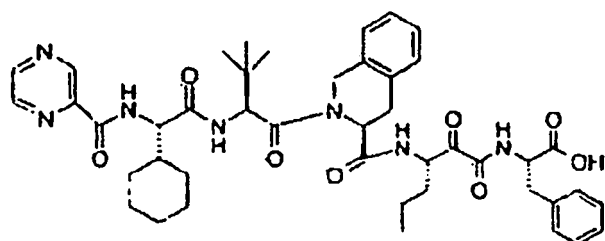
EX.



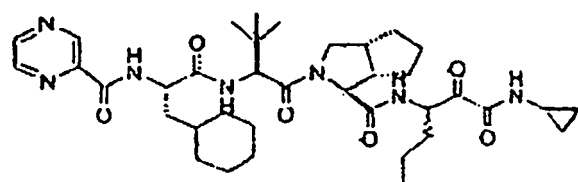
EY.



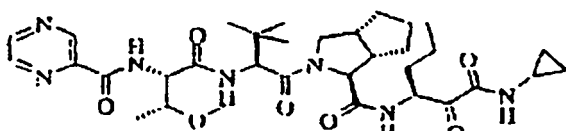
FZ.



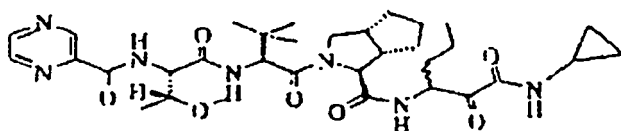
GA.



FB.



FC.



FD.

50

55

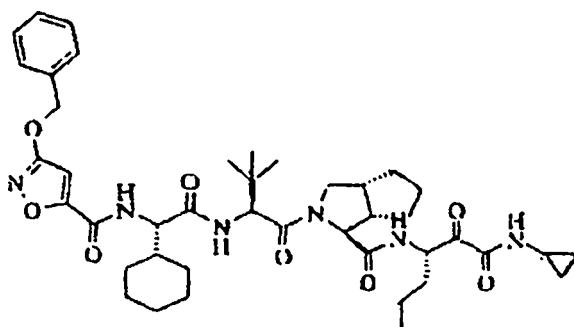
60

65

5

10

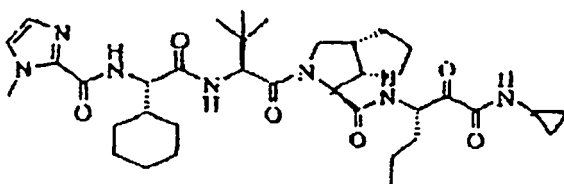
15



FE.

20

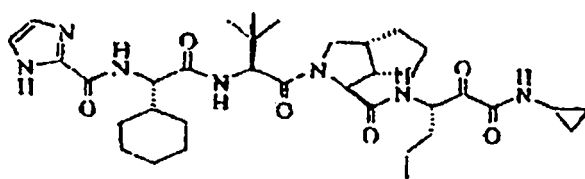
25



FF.

30

35

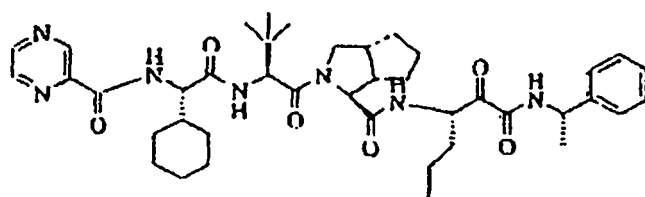


FG, and

40

45

50



FH.

55

60

65

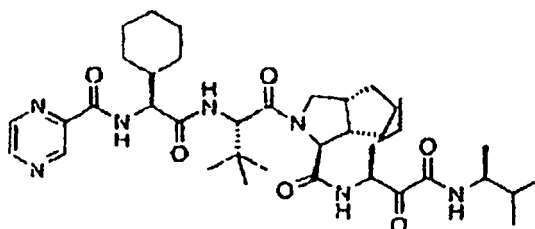
Ejemplo 28

Compuestos de comparación CV-DC

5 El compuesto cxxx (330 mg, 0,46 mmol) se disuelve en DCM (5 ml), a esta solución se le añade reactivo de DMP (240 mg, 0,56 mmol) y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na_2SO_3 al 10% y la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera.

10 Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cxxx (280 mg, 85,9%).

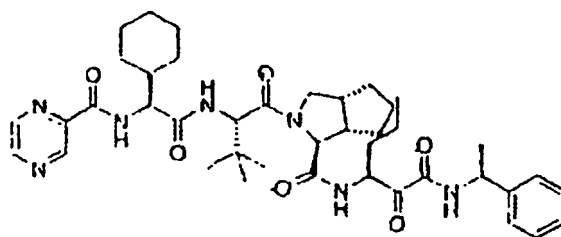
15



20

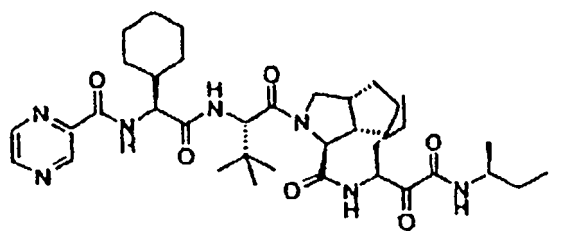
25 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CW-DC:

25



30

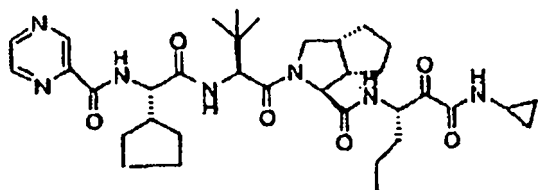
35



40

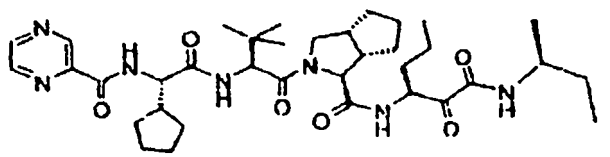
45

50

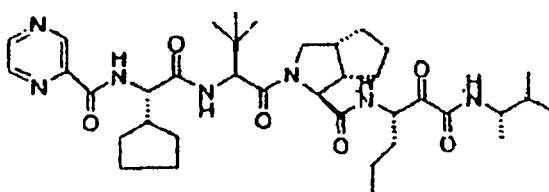


55

60

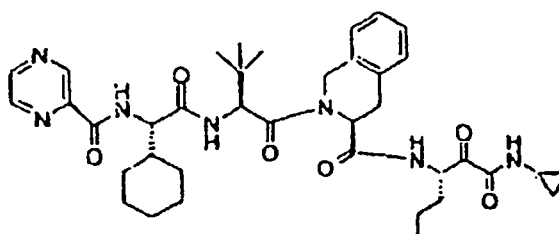


65



5

10

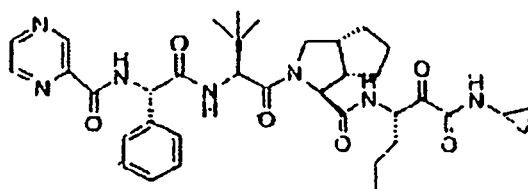


15

20

y

25



30

35

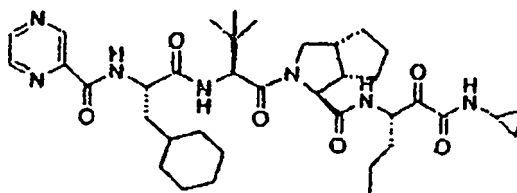
Ejemplo 29

Compuestos de comparación DD-DE

40

A una solución en DCM (6 ml) del compuesto cxxxviii (400 mg, 0,57 mmol) se le añade reactivo de DMP (362 mg, 0,85 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica extraída se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 y se concentra, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación con gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos) produce el compuesto DD (201 mg, 51%).

45

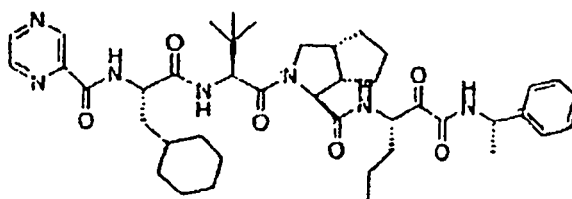


50

55

Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados se prepara el siguiente compuesto DE:

60



65

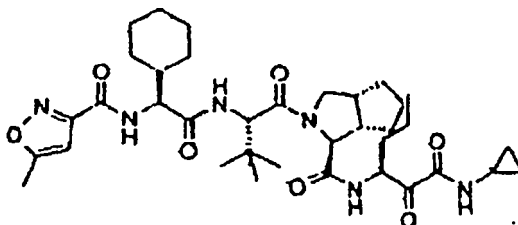
Ejemplo 30

Compuesto de comparación DF

5 El compuesto cxxxxiii (165 mg, 0,24 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). a la solución se le añade reactivo de DMP (125 mg, 0,29 mmol) y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na_2SO_3 al 10% y la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 70%/hexanos, produciendo el compuesto DF (108 mg, 65,6%).

10

15



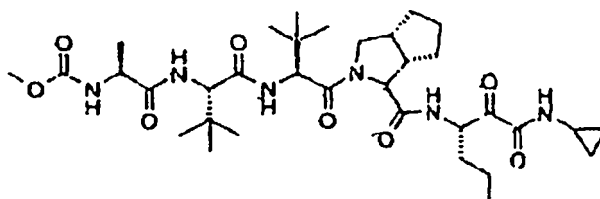
Ejemplo 31

Compuestos de comparación DG-DJ

25 A una solución del compuesto cil (0,350 g, 0,516 mmol) en DCM (15 ml) enfiada en un baño de hielo se le añade reactivo de DMP (0,281 g, 0,671 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, después se inactiva con una solución al 10% de Na_2SO_3 y se agita durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con DCM (3 x 20 ml) y el extracto orgánico se seca (MgSO_4). Después de la filtración para retirar el MgSO_4 , el filtrado se concentra y se purifica por cromatografía en columna (Acetato de etilo al 70%/Hexanos), produciendo el compuesto final DG (0,265 g, 76%) en forma de un sólido de color blanco.

30

35

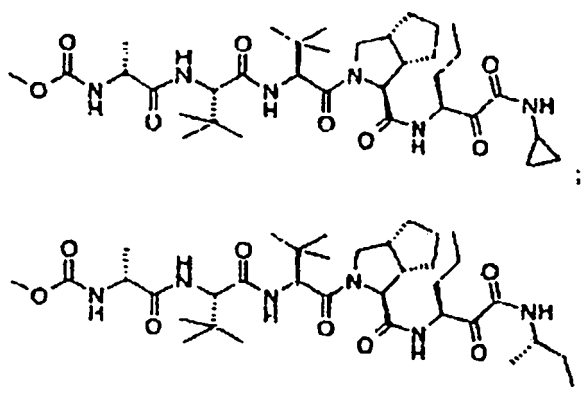


40 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DH-DJ:

45

50

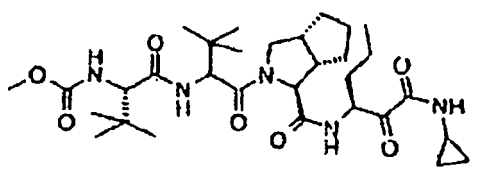
55



y

60

65



Ejemplo 32

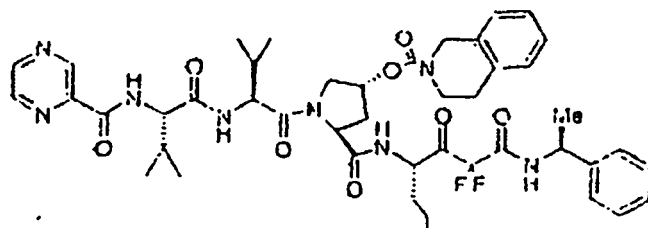
Compuestos de comparación OK-DN

5 Una solución en DCM del compuesto clx (108 mg, 0,123 mmol) se trata con reactivo de DMP (78 mg, 0,185 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y después se interrumpe con Na₂SO₃ al 10%. Después de agitar durante 30 minutos, la fase orgánica se separa y se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos), produciendo el compuesto DK (84 mg, 78%).

10

15

20



25 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos DL-DN.

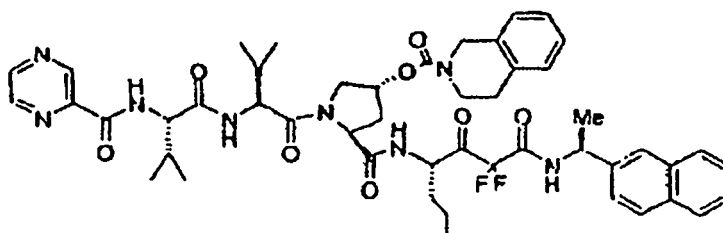
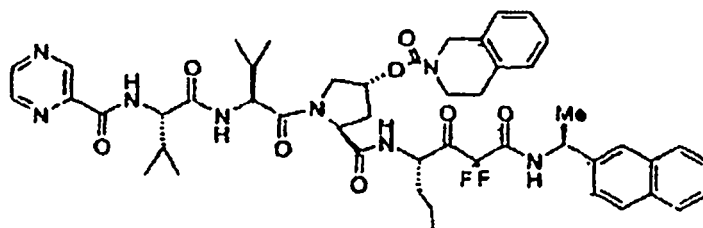
30

35

40

45

50

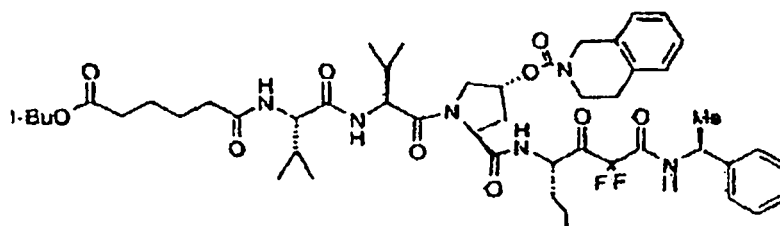


y

55

60

65



Ejemplo 33

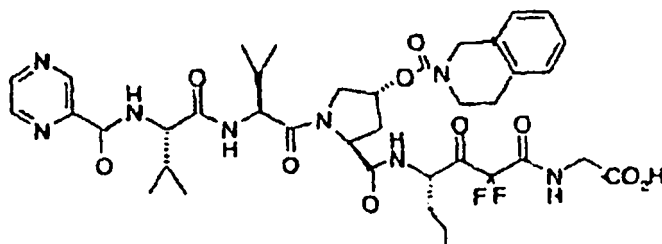
Compuestos de comparación DO-DS

- 5 Una solución en EtOH (10 ml) del compuesto clxii (174 mg, 0,189 mmol) se hidrogena usando Pd/C (30% equiv., 60 mg, contenido de paladio del 10%) durante 2,5 horas. Después, el catalizador se retira por filtración. El filtrado resultante se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía semi-preparativa de fase inversa y se liofiliza, produciendo el compuesto DO con un rendimiento del 70%.

10

15

20

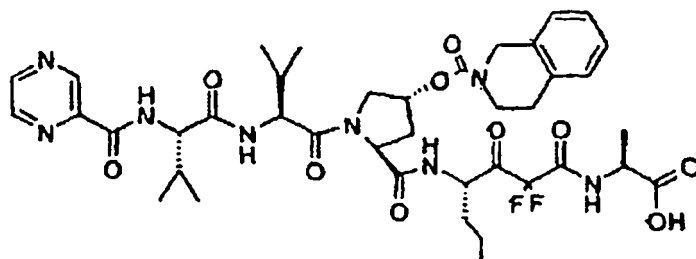


25

30 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DP-DS.

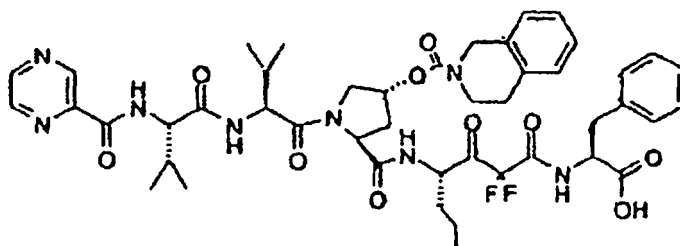
30

35



40

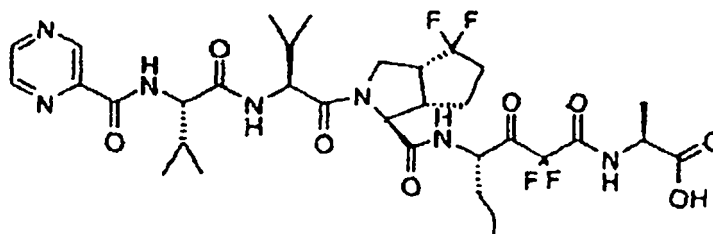
45



50

55

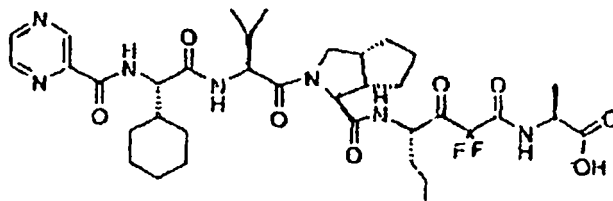
60



65

y

5



10

Ejemplo 34

15 *Compuesto de comparación CW*

20

El compuesto clxiii (175 mg, 0,24 mmol) se recoge en DCM (3 ml). A esta solución se le añade agente DMP (120 mg, 0,28 mmol) y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% y se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. La purificación por EtOAc al 70% produce el compuesto CW (134 mg, 75%).

Ejemplo 35

25

Compuestos de comparación CY y DT-DX

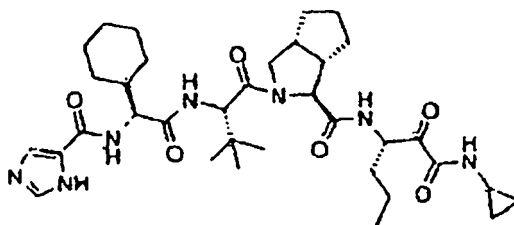
30

A una solución en DCM (15 ml) de clxxii (290 mg, 0,43 mmol) se le añade reactivo de DMP (239 mg, 0,56 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 8-100%/Hexanos), dando el compuesto CY (151 mg, 52%).

35

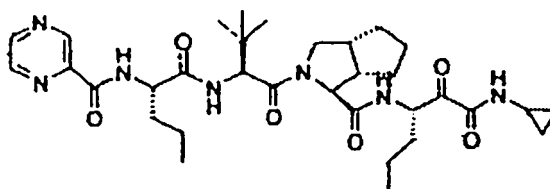
Si siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DT-DX.

40



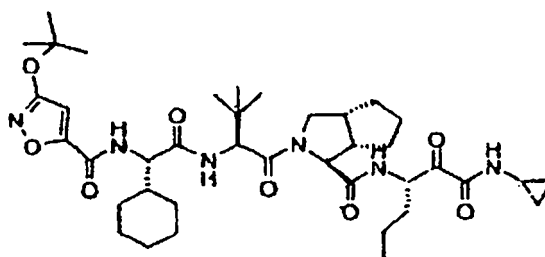
45

50

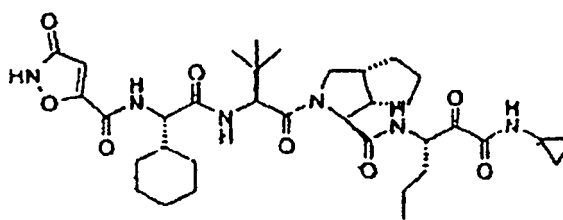


55

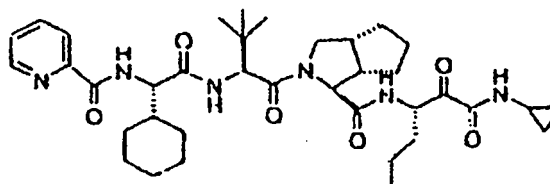
60



65



y

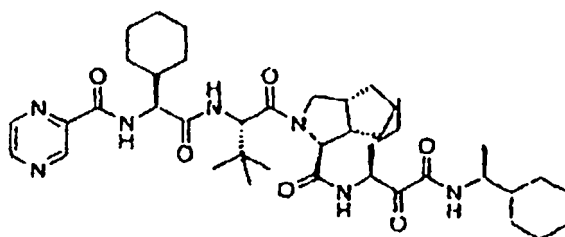


Ejemplo 36

Compuestos de comparación DY

El compuesto lxxxv (1,17 mmol) se recoge en DCM (5 ml). A esta solución se le añade reactivo de DMP (543 mg, 1,3 mmol) y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 Mmol/g de resina) y se agita durante una hora. Se añade resina eliminadora P-TBD* (2,5 mmol/g de resina) y se agita durante 45 minutos. La mezcla resultante se filtra y se purifica con EtOAc al 50%, dando el compuesto DY (440 mg, 50,2% en dos etapas).

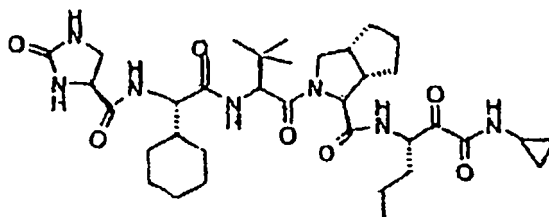
*Referencia para la resina eliminadora P-TBD: J. Parlow y col. Tetrahedron, 55, 6785-6796 (1999).



Ejemplo 37

Compuesto de comparación DZ

El compuesto material de partida clxxxxi (94 mg, 0,14 mmol) se disuelve en una mezcla de THF (10 ml) y DCM (20 ml). Después, se añade reactivo de DMP (118 mg, 0,28 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene Dri Solv THF (120 ml). La reacción se lava con Na₂SO₃ al 10% (50 ml) y después con salmuera (75 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. Después se realiza la cromatografía (gel de sílice: elución con Dri Solv THF al 50%/EtOAc, y después MeOH al 4%/THF). Las fracciones se comprueban mediante análisis por EM. Las fracciones apropiadas se liofilizan, produciendo el compuesto DZ (38,8 mg, 41%).

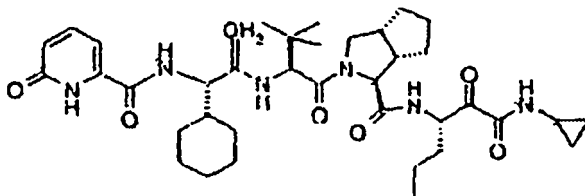


ES 2 325 481 T3

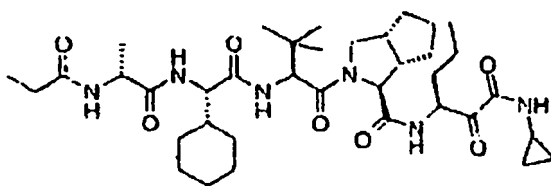
Ejemplo 38

Compuestos de comparación EA-EB

5 El compuesto de partida clxxxxv (185 mg, 0,26 mmol) se disuelve en THF (20 ml). Después, se añade el reactivo de DMP (219 mg, 0,52 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, el análisis por TLC muestra la conversión completa en la cetona (MeOH al 5%/THF). La reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene Dri Solv THF (120 ml). La reacción se lava con Na₂SO₃ al 10% (50 ml) y después con salmuera (75 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía (gel de sílice: elución con Dri Solv THF al 50%/EtOAc, y después MeOH al 4%/THF) y las fracciones se comprueban mediante análisis por UV y EM. Las fracciones apropiadas se liofilizan, produciendo el compuesto EA (159 mg, 88%).



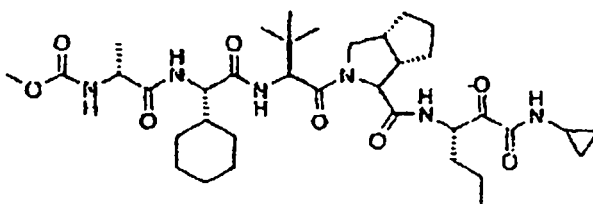
25 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto EB:



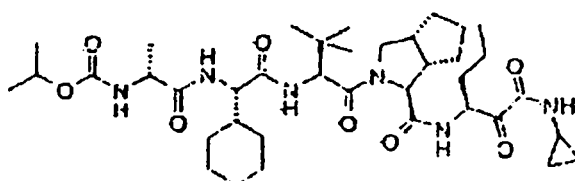
35 Ejemplo 39

Compuestos de comparación EC-ED

40 A una solución del compuesto clxxxviii (0,341 g, 0,503 mmol) en DCM (15 ml) enfriada en un baño de hielo se le añade reactivo de DMP (0,277 g, 0,654 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, después se inactiva con una solución al 10% de Na₂SO₃ y se agita durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con DCM (3 x 20 ml) y el extracto orgánico se seca (MgSO₄). Después de la filtración para retirar el MgSO₄, el filtrado se concentra y se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 70%/Hexano), dando el compuesto EC (0,183 g, 54%) en forma de un sólido de color blanco.



55 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto ED:



ES 2 325 481 T3

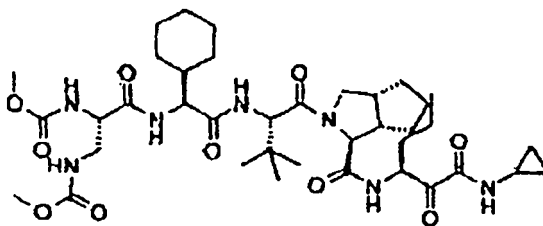
Ejemplo 40

Compuestos de comparación EE-EG

5 El compuesto ccii (290 mg, 0,37 mmol) se recoge en DCM (5 ml). A esta solución se le añade reactivo de DMP (175 mg, 0,41 mmol) y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 mmol/g de resina) y se agita durante 1 hora. El reactivo de DMP inactivado se elimina con P-TBD (2,5 mmol/g de resina) y se agita durante 1 hora. La mezcla resultante se filtra y se aclara con DCM antes de concentrarse para dar un residuo. El residuo resultante se purifica con EtOAc al 50%/Hex, produciendo el compuesto EE (440 mg, 28%).

10

15

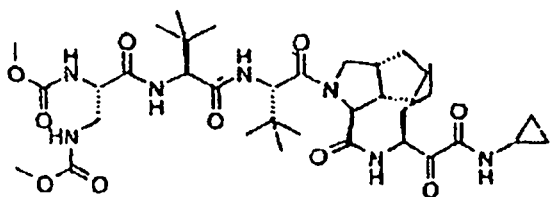


20

25 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto anterior y procedimientos relacionados para preparar el intermedio del mismo, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos EF-EG:

25

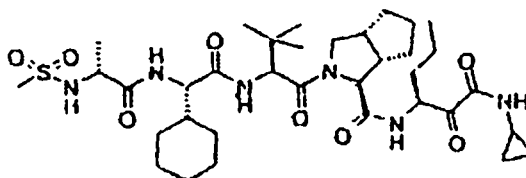
30



35

y

40



45

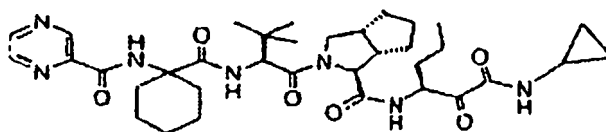
Ejemplo 41

50

Compuesto de Comparación EH

55 A una solución en DCM (3 ml) del compuesto cciii (140 mg, 0,2 mmol) se le añade reactivo de DMP (133 mg, 0,3 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, dando un aceite de color amarillo que se purifica con gel de sílice (EtOAc al 70%/hexano), y después se liofiliza, produciendo el compuesto EH (50 mg, 38%).

60



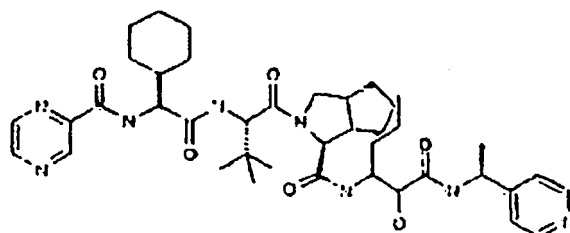
65

ES 2 325 481 T3

Ejemplo 42

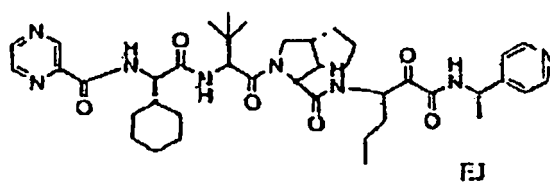
Compuesto de comparación EJ

5 El compuesto ixiii (520 mg, 1 mmol) se recoge en DCM (5 ml). A la solución anterior se le añade PyBOP (624 mg, 1,2 mmol) y se agita durante 5 minutos. A esta solución se le añade gota a gota el compuesto cdviii (300 mg, 1,2 mmol) en THF (5 ml), seguido de DIPEA (0,22 ml, 1,2 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche, en atmósfera de nitrógeno. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra, dando el intermedio acoplado en
10 bruto cdix.



cdix

25 Este intermedio cdix (-1 mmol) se recoge en DCM (10 ml). A esta solución se le añade Peryodinano de Dess-Martin (-166 mg, 1,1 mmol). Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con Na₂SO₃ unido a polímero (740 mg, 1,5 mmol DMP/g de resina) y se agita durante 45 minutos. Después, la mezcla de reacción se elimina con resina TBD unida a polímero (440 mg, 2,3 mmol DMP/g de resina). La mezcla resultante se agita durante 45 minutos y después se filtra. La purificación se consigue en EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto EJ (245 mg, 32% en 2 etapas). Puede encontrarse una referencia bibliográfica para el procedimiento de trabajo en Tetrahedron 55 (1999) 6785-6796.
30

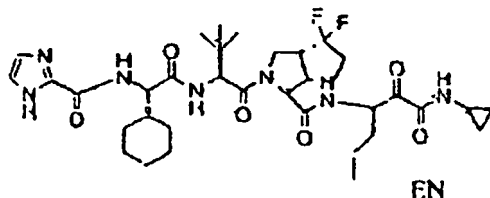


EJ

Ejemplo 43

Compuesto de comparación EN

45 El compuesto intermedio cdvii (415 mg, 0,59 mmol) se recoge en DCM (10 ml) y THF (10 ml) y se añade *t*-BuOH (300 μ l) seguido de Peryodinano de Dess-Martin (750 mg, 1,77 mmol). La reacción se agita durante 50 minutos y después se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 mmol DMP/g de resina). Después de agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se elimina con P-TBD (2,5 mmol DMP/g de resina). Después de agitar durante 1 hora, la mezcla resultante se filtra y se concentra. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc del 50% al 70%/Hexanos), produciendo el compuesto EN (220 mg, 53%).
50



EN

Se obtuvieron Espectros de Masas [M] para los siguientes compuestos como se muestra en la siguiente Tabla I.

65

ES 2 325 481 T3

TABLA 1

	<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Encontrada</u>
5		A	733,3
		B	747,2
10		C	657,2
		D	769,4
		E	733,4
15		F	625,4
		G	639,3
		H	661,4
20		I	643,4
		J	707,3
		K	641,3
25		L	689,3
		M	639,3
		N	639,4
30		O	731,4
		P	687,4
		Q	633,4
35		R	701,4
		S	639,3
40		T	747,1
		U	655,4
		V	653,4
45		W	703,4
		X	661,3
		Y	647,3
50			
55			
60			
65			

ES 2 325 481 T3

	<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Encontrada</u>
		Z	663,3
5		AA	667,4
		AB	711,4
		AC	725,4
10		AD	647,3
		AE	779,4
		AF	689,3
15		AG	671,4
		AK	806,4
		AH	687,5
20		AI	735,4
		AJ	736,5
		AM	870,4
25		AN	813,3
		AP	724,4
		AQ	653,4
30		AR	628,2
		AW	642,2
		AX	614,2
35		AY	628,3
		BD	570,3
40		BE	520,2
		BF	534,3
		BG	584,3
45		BU	890,3
		BV	685,4
		BW	679,3
50		BX	695,3
		BY	697,3
		BZ	787,4
55		CA	701,3
		CB	669,4
60		CC	733,5
		CD	643,3
65			

ES 2 325 481 T3

LY N°	Ejemplo	Masa Encontrada
	CE	653,5
5	CH	749,4
	CI	653,3
	CJ	717,5
10	CK	683,4
	CL	669,3
	CM	675,2
15	CN	717,2
	CO	653,3
	CP	683,3
20	CQ	669,3
	CR	675,2
	CT	661,8
25	CS	639,3
	CU	679,2
	CV	709,3
30	CW	743,3
	CX	695,3
	CY	665,2
35	CZ	681,3
	DA	695,3
	DB	701,2
40	DC	673,3
	DD	693,3
	DE	757,4
45	DF	682,3
	DG	676,3
	DH	676,2
50	DI	692,5
	DJ	605,2
55	DK	874,4
	DL	924,5
	DM	924,2
60	DN	952,7
65		

ES 2 325 481 T3

	<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Encontrada</u>
		DO	830
5		DP	842,5
		DT	667,4
		DU	639,2
10		DV	740,3
		DW	684,2
		DX	678,5
15		DY	749,3
		DZ	685,3
		EA	649,3
20		EB	700,3
		EC	702,3
		ED	730,3
25		EE	775,3
		EF	749,3
		EG	722,3
30		EH	665,2
		EI	796,4
35		EJ	744,3
		EK	730,5
		EL	730,5
40		EM	757,3
		EN	703,5
		EO	715,5
45		EP	679,2
		EQ	631,3
		ER	715,3
50		ES	668,5
		ET	732,5
		EU	743,3
55		EV	683,3
		EW	750,4
60		EX	786,4
		EY	744,5
65			

ES 2 325 481 T3

LY N°	Ejemplo	Masa Encontrada
	EZ	780,4
5	FB	693,4
	FC	655,3
	FD	655,3
10	FE	774,4
	FF	681,5
15	FG	667,5

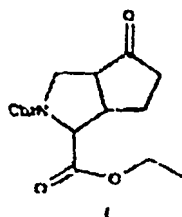
Los Espectros de Masas de Alta Resolución (EMAR) de los siguientes compuestos se obtuvieron como se muestra en la Tabla 2.

Ejemplo	Fórmula Molecular (M+1)	EM Calculado (M+1)	Masa Encontrada (M+1)
L	C37H52N7O6	690,3979	690,3986
M	C33H50N7O6	640,3822	640,3822
35	Z	C32H48F2N7O6	664,3634
	AB	C36H48F2N7O6	712,3634
	CE	C34H52N7O6	654,3979
40	EN	C35H52N7O6F2	704,3947
	EK	C37H63N6O8S	751,4428
	EC	C36H59N6O8	703,4395
45	CA	C35H50N7O6F2	702,3790
	EZ	C40H55N8O6F2	781,4213
	EU	C36H52N7O6F2	716,3947
50	CY	C35H52N7O6	666,3979
	BX	C37H58N7O6	696,4448
	S	C33H50N7O6	640,3823
55	BW	C36H54N7O6	680,4136
	CU	C36H54N7O6	680,4136
60	EJ	C40H57N8O6	745,4401
	EM	C35H54N7O6	668,4136
65	Ninguno	C41H58N7O6	744,4448
			744,4691

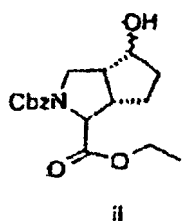
ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 1 - compuesto ii

A una solución en etanol (40 ml) del compuesto i (8,1 g, 24,4 mmol)

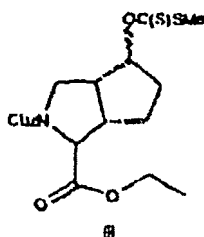


15 se le añade NaBH_4 (924 mg, 24,4 mmol) a -10°C . La reacción se agita a esa temperatura durante 30 minutos y después se interrumpe con AcOH (3 ml). La mezcla de reacción se diluye con EtOAc (250 ml), y se lava con NaHCO_3 y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/Hexanos), proporcionando 7,85 g (97%) del compuesto ii,



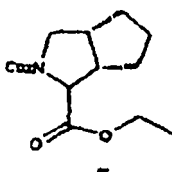
Ejemplo Intermedio 2 - compuesto iii

30 A una solución en THF (70 ml) del compuesto ii (4,48 g, 13,4 mmol) se le añade a 0°C NaH (699 mg, 60%, 17,42 mmol). Después de agitar a esa temperatura durante 40 minutos, se añade Met puro (1,25 ml, 20,1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se interrumpe cuidadosamente con una solución saturada de NH_4Cl a 0°C . La mezcla de reacción se extrae con Et_2O y EtOAc. La fase orgánica se lava con agua y salmuera y se seca con Na_2SO_4 . La fase orgánica obtenida de esta manera se concentra al vacío, proporcionando el compuesto xantano iii.



Ejemplo Intermedio 3 - compuesto iv

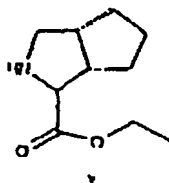
55 El compuesto de xantano iii (~13,4 mmol) se disuelve en tolueno (100 ml). A esta solución se le añade AIBN (216 mg, 1,34 mmol). La solución resultante se desgasifica con nitrógeno seco y después se trata con $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$ (5,4 ml, 20,1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 90°C durante 3 horas. En este momento, la reacción se enfría a temperatura ambiente y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 15-20%/Hexanos), proporcionando 2,8 g (66% total del compuesto ii) del compuesto iv,



ES 2 325 481 T3

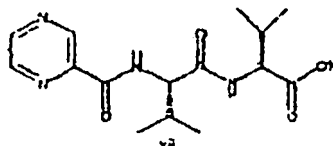
Ejemplo Intermedio 4 - compuesto v

A una solución en etanol (31 ml) del compuesto iv (1 g, 3,15 mmol) se le añade Pd(OH)₂/C (655 mg, 20%, 0,95 mmol) en una corriente de nitrógeno. La mezcla de reacción resultante se somete a hidrogenación convencional (1,5 atm). Después de 5 horas, la fuente de hidrógeno se retira y la reacción se filtra. Los filtrados se concentran al vacío, proporcionando el compuesto de amina libre v,

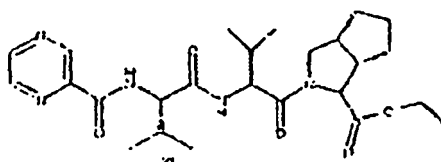


Ejemplo Intermedio 5 - compuesto vi

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto vii (629 mg, 1,95 mmol) se le añade aproximadamente a la temperatura ambiente

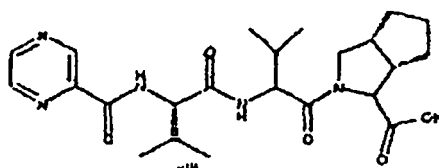


HOAt (265 mg, 1,95 mmol) seguido de una solución 1 M de DCC en DCM (1,95 15 ml, 1,95 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, al ácido activado con HOAt anterior se le añade una solución en DCM (3 ml) del compuesto v (1,5 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se diluyen con EtOAc (75 ml) y se lavan con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70-80%/Hexanos), produciendo 620 mg (85%) del compuesto vi,



Ejemplo Intermedio 6 - compuesto viii

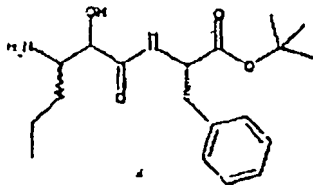
A una solución en etanol (10 ml) del compuesto vi (615 mg, 1,26 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (1,26 ml, 2,52 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 usando resinas ácidas Dowex. Los sólidos se retiran por filtración y los filtrados se concentran al vacío, dando un residuo que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH₃CN/H₂O. Esta solución se somete a liofilización, proporcionando 495 mg (85%) del compuesto viii,



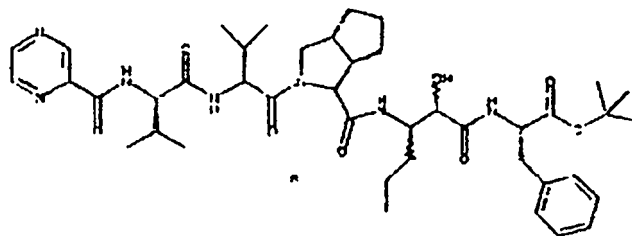
ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 7 - compuesto ix

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto viii (230 mg, 0,5 mmol) se le añade PyBop (417 mg, 0,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (5,25 ml) del compuesto x (263 mg, 0,75 mmol) seguido de

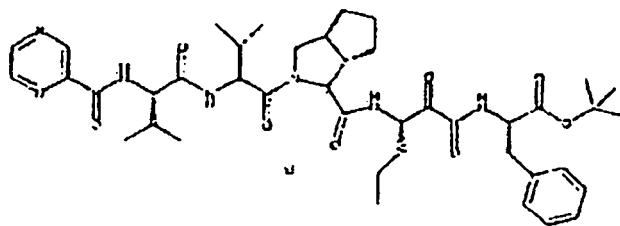


DIPEA (0,174 ml, 1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (30 ml) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), dando 400 mg (100%) del compuesto ix,



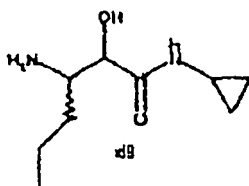
Ejemplo Intermedio 8 - compuesto xi

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto ix (396 mg, 0,5 mmol) se le añade reactivo de DMP (278 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1 hora y después se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% durante 30 minutos. Después, la mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml) y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/Hexanos), dando 320 mg (81%) del compuesto xi,



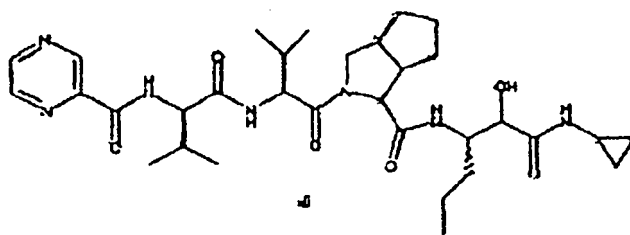
Ejemplo Intermedio 9 - compuesto xii

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto viii (230 mg, 0,5 mmol) se le añade PyBop (417 mg, 0,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (3,5 ml) del compuesto xiii (140 mg, 0,75 mmol) y



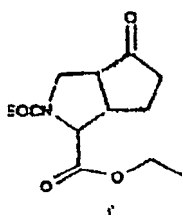
seguido de DIPEA (0,174 ml, 1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (30 ml) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml). La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), dando el compuesto xii con rendimiento cuantitativo,

ES 2 325 481 T3



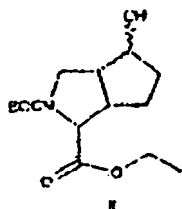
Ejemplo Intermedio 10 - *compuesto i'*

A una solución en metanol (30 ml) del compuesto **i** (5 g, 15,1 mmol) se le añaden $(\text{BOC})_2\text{O}$ (3,3 g, 15,1 mmol) y $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (1,6 g, contenido de Pd al 10%). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtra dos veces a través de Celite. El lecho de Celite se aclara con DCM. Los filtrados combinados se concentran al vacío, produciendo un residuo oleoso que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos), dando 3,8 g (85%) del compuesto **i'**,



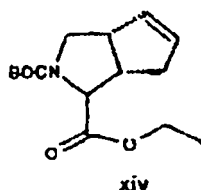
Ejemplo Intermedio 11 - *compuesto ii'*

A una solución en metanol (111 ml) del compuesto **i'** (3,7 g, 12,5 mmol) se le añade a 0°C NaBH_4 (0,805 g, 21 mmol). Después de agitar a 0°C durante 2,5 horas, el disolvente de la reacción se evapora lentamente al vacío, produciendo un residuo que se diluye con EtOAc. Después, esta solución se lava con agua dos veces. La fase acuosa se extrae con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secan con MgSO_4 , se filtra y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica con cromatografía, proporcionando 3,76 g (99%) del compuesto **ii'**,



Ejemplo Intermedio 12 - *compuesto xiv*

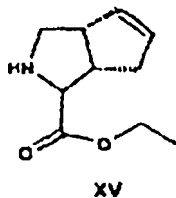
A una solución en DCM (180 ml) del compuesto **ii'** (3,76 g, 12,3 mmol) se le añade a 0°C DMP (5 g, 40,1 mmol) seguido después de de TTO_2 (4 ml, 23,7 mmol). La reacción se agita a 0°C durante 1 hora y aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1,5 horas más. Después, la mezcla de reacción se lava dos veces con NaHCO_3 al 5% y se seca con MgSO_4 . La fase orgánica obtenida de esta manera se concentra al vacío, proporcionando el triflato en bruto. El triflato resultante (2,7 g, 6 mmol) se disuelve en DCM (120 ml). A esta solución se le añade DMAP (2,5 g, 20,5 mmol). La mezcla de reacción resultante se calienta a reflujo durante una noche. En este momento, la reacción se enfría a temperatura ambiente y se lava dos veces con NaHCO_3 al 5%. La mezcla de reacción se seca con MgSO_4 , se filtra y se concentra al vacío, produciendo un residuo oleoso de color parduzco que se purifica (MeOH al 1%/DCM), dando 500 mg (30%) del compuesto **xiv**,



ES 2 325 481 T3

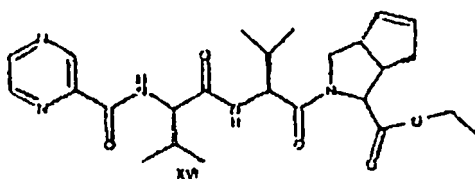
Ejemplo Intermedio 13 - compuesto xv

El compuesto xiv (500 mg, 1,8 mmol) se disuelve en HCl 4 N en dioxano (6,75 ml). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante ~4 horas. En este momento, el disolvente se retira al vacío. El residuo resultante se valora dos veces con éter dietílico, dando la sal HCl del compuesto xv con rendimiento casi cuantitativo,



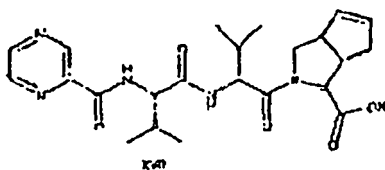
Ejemplo Intermedio 14 - compuesto xvi

A una solución en THF (7 ml) del compuesto vii (579 mg, 1,8 mmol) se le añaden HOAt (245 mg, 1,8 mmol) y DCC (1,8 ml, 1 M en DCM). Se produce como resultado una suspensión. Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 15 minutos, a la suspensión anterior se le añade una solución en THF (6 ml) del compuesto xv (1,8 mmol) y DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmol). Después se añade más cantidad de DIPEA (0,8 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. En ese momento, los sólidos de color blanco formados de esta manera se retiran por filtración. Los sólidos de color blanco se aclaran con THF. Los filtrados y los lavados combinados se concentran al vacío, dando el producto en bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 100%), proporcionando 665 mg (76%) del compuesto xvi.



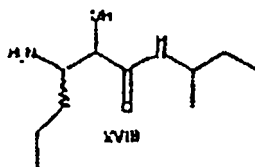
Ejemplo Intermedio 15 - compuesto xvii

A una solución en etanol (8 ml) de 7 (665 mg, 1,37 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (2,4 mmol) a 0°C. La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 usando resinas ácidas Dowex. Los sólidos se filtran. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, dando un residuo de color amarillo pálido que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH₃CN/H₂O y se liofiliza, dando 467 mg (74%) del compuesto xvii,



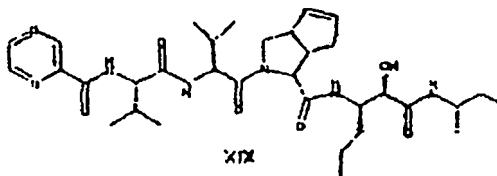
Ejemplo Intermedio 16 - compuesto xix

Una solución en DCM (4 ml) del compuesto xvii (100 mg, 0,22 mmol) se trata con PyBop 5 (207 mg, 0,4 mmol) aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos. En este momento, la solución anterior se trata con una solución en THF (2,6 ml) del compuesto xviii (65 mg, 0,32 mmol), seguido de DIPEA



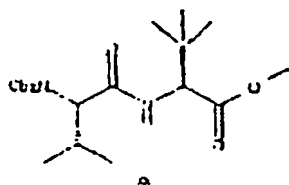
ES 2 325 481 T3

(0,076 ml). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 7 horas, la reacción se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se diluye con DCM (60 ml). La fase orgánica se separa y se lava dos veces con salmuera y se seca con $MgSO_4$. Después de la filtración, se concentra y se cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), obteniendo 148 mg (~100%) del compuesto xix.



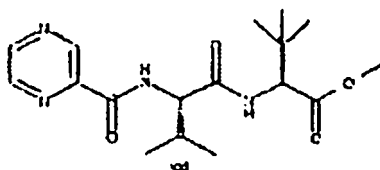
Ejemplo Intermedio 17 - compuesto xx

A una solución en THF (100 ml) de N-Cbz-L-valina (14,4 g, 57,2 mmol) se le añaden HOBt (7,72 g, 57,2 mmol) y EDCI (10,98 g, 57,2 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en THF (50 ml) que contiene clorhidrato de éster metílico de *tert*-L-Leucina (10,4 g, 57,2 mmol) y DIPEA (11,9 ml, 68,7 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. Después del tratamiento acuoso convencional y la cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 30%/Hexanos), se obtienen 14 g (64%) del compuesto xx.



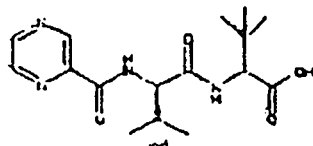
Ejemplo Intermedio 18 - compuesto xxi

A una solución en metanol (80 ml) de xx (6,71 g, 17,7 mmol) se le añade (en una corriente de N_2) Pd/C (1,88 g, contenido de Pd al 10%). El recipiente de reacción se somete a hidrogenación (1 atm H_2) durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. En este momento, la mezcla de reacción se filtra a través de una capa de Celite y se concentra al vacío, proporcionando la amina libre en bruto correspondiente para la siguiente etapa. Una solución en THF de esta amina (~17,7 mmol) se añade a una solución en THF (46 ml) y DMF (5 ml) que contiene ácido 2-pirazinacarboxílico (2,85 g, 23 mmol), Hobbitt (3,12 g, 23 mmol) y EDCI (4,41 g, 23 mmol). Después, a la mezcla resultante se le añade PIPEA (3,08 g, 17,7 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío, proporcionando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40-50%/Hexanos), proporcionando 3,9 g (63%) del compuesto xxi,



Ejemplo Intermedio 19 - compuesto xxii

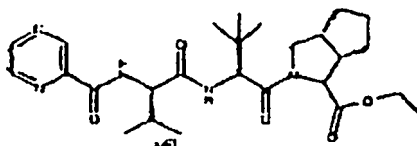
A una solución en metanol (40 ml) del compuesto xxi (4,67 g, 13,34 mmol) se le añade NaOH 2 N (10 ml, 20 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas. En este momento, a la mezcla de reacción se le añade una cantidad adicional de NaOH 2 N (3,3 ml, 6,67 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, la reacción se acidifica a pH 3 usando resina ácida. Después, la reacción se filtra y los filtrados se concentran al vacío, produciendo un residuo que se disuelve en 1:1 de CH_3CN/H_2O para la liofilización, y se obtienen 4,15 g (93%), del compuesto xxii.



ES 2 325 481 T3

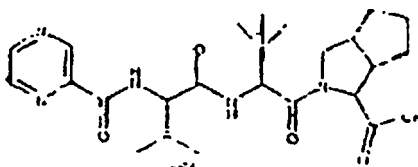
Ejemplo Intermedio 20 - compuesto xxiii

Una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxii (917 mg, 2,73 mmol) se trata con HOAt (371 mg, 2,73 mmol) y DCC (2,73 ml, 1 M, 2,73 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto v (500 mg, 2,73 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, los sólidos de color blanco (urea) se filtran. Los filtrados se concentran al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 60-70%/Hexanos), proporcionando 1,06 g (77%) del compuesto xxiii,



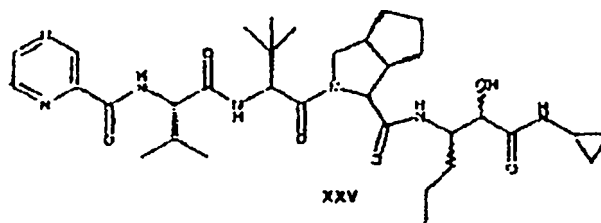
Ejemplo Intermedio 21 - compuesto xxiv

Una solución en etanol (20 ml) del compuesto xxiii (1,06 g, 2,11 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,11 ml, 4,23 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con resina ácida. Los sólidos se retiran por filtración. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, dando un residuo que se liofiliza, dando 1 g (100%) del compuesto xxiv,



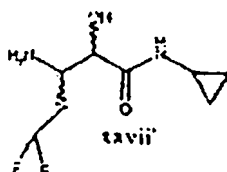
Ejemplo Intermedio 22 - compuesto xxv

Una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxiv (236,7 mg, 0,5 mmol) se trata con PyBop (417 mg, 0,8 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en DMF (5,6 ml) del compuesto xiii (139,5 mg, 0,75 mmol), seguido de DIPEA (0,174 ml, 1 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 8 horas, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), produciendo ~320 mg (100%) del compuesto xxv,



Ejemplo Intermedio 23 - compuesto xxvi

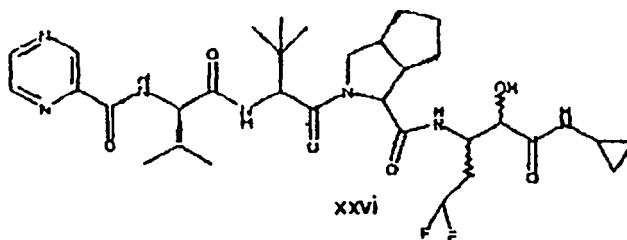
Una solución en DCM (15 ml) del compuesto xxiv (355 mg, 0,75 mmol) se trata con PyBop (622 mg, 1,2 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto xxvii' (156 mg, 0,75 mmol), seguido de DIPEA (0,26 ml, 1,5 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (2% EtOH/EtOAc), produciendo ~400 mg (80%) del compuesto xxvi,



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 24 - Metil 5-cianopentanoato

Se disuelve cianuro potásico (4 g, 61,44 mmol) en 70 ml de agua y 200 ml de metanol. A la solución se le añaden 10 g (51,2 mmol) de 5-bromopentanoato de metilo y la mezcla se calienta a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se concentra a sequedad. Al residuo se le añaden 100 ml de EtOAc para extraer el producto. La fase orgánica se lava tres veces con agua, se seca y se concentra, produciendo 5,37 g (74%) de 5-cianopentanoato de metilo en forma de un aceite.



Ejemplo Intermedio 25 - 5-Tetrazol-5-ilpentanoato de metilo

Se disuelve 5-cianopentanoato de metilo (4,8 g, 34 mmol) en tolueno y se añade cloruro de trietilamonio (14 g, 103 mmol) y azida sódica (6,63, 102 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se añade agua para extraer (3 x 100 ml) el 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo de la fase orgánica. A la fase acuosa se le añade HCl concentrado para ajustar el pH a 2. El producto se extrae de la solución acuosa con EtOAc (3 x 50 ml). La fase orgánica se combina, se seca y se concentra, produciendo 4,25 g (68%) de 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo.

Ejemplo Intermedio 26 - 5-[N-(1,1-Dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo

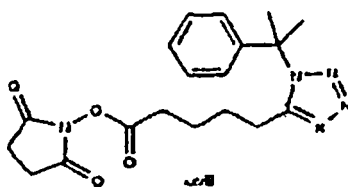
Se disuelven 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo (4,23 g, 23 mmol) y ácido tricloroacético (8,69 g, 53 mmol) en 50 ml de CHCl_3 . A la solución se le añade gota a gota α -metilestireno (2,72, 23 mmol), y la mezcla de reacción se deja en agitación aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 200 ml y la fase orgánica se lava con KOH acuoso al 10% y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida, produciendo 6,6 g (95%) de 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo.

Ejemplo Intermedio 27 - Ácido 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico

Se disuelve 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo (6,6 g, 21,8 mmol) en metanol (100 ml) y se añaden 23 ml de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agita durante una noche y se concentra para retirar el metanol. El residuo se disuelve en agua (100 ml) y la solución se neutraliza mediante la adición del mismo equivalente de HCl acuoso 1 N. El producto se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). La fase orgánica se seca y se concentra, produciendo 4,75 g (75%) de ácido 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico.

Ejemplo Intermedio 28 - compuesto xxxviii

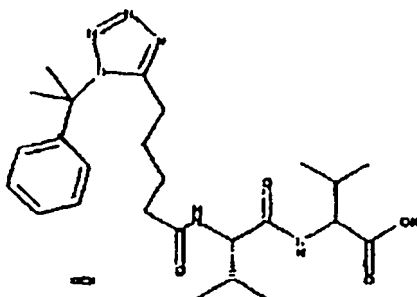
Se disuelve ácido 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico (4,75 g, 16,5 mmol) en DCM (100 ml) y se añaden 4,8 g (24,8 mmol) de EDCI y 6 ml de DIPEA. A la mezcla se le añade N-hidroxilsuccinimida (3,8 g, 33 mmol). La mezcla de reacción se agita durante tres horas aproximadamente a la temperatura ambiente. La mezcla se diluye con DCM hasta alcanzar un volumen de 200 ml y la solución se lava tres veces con agua. La fase orgánica se seca y se concentra, produciendo 4,79 g (75%) del compuesto xxxviii,



ES 2 325 481 T3

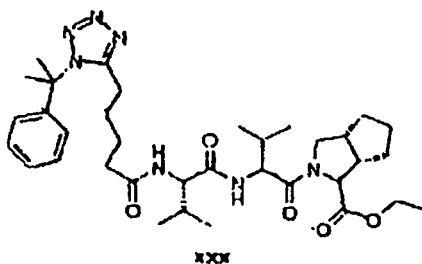
Ejemplo Intermedio 29 - compuesto xxix

El dipéptido H-Val-Val-OH (3,22 g, 14,9 mmol) se suspende en 50 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) y se añaden 4,75 g (12,42 mmol) del compuesto xxviii seguido de la adición de 3,4 ml (18,63 mmol) de diisopropiletilamina (DIPEA). La mezcla se calienta hasta 40°C y se agita durante una noche. El disolvente se evapora a alto vacío. El residuo se disuelve en EtOAc y se lava con HCl 1 N y salmuera, produciendo 5,52 g (91%) del compuesto xxix,



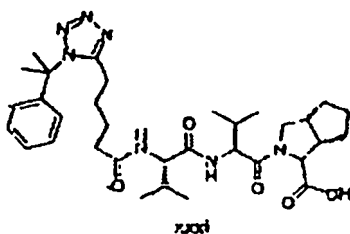
Ejemplo Intermedio 30 - compuesto xxx

Se disuelven 1,6 g (3,29 mmol) del compuesto xxix en 20 ml de DCM y se añaden 3,3 ml de una solución 1 M de DCC en THF. A la mezcla se le añaden 500 mg (2,73 mmol) del compuesto v. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera. Se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano), produciendo 1,02 g (58%) del compuesto xxx.



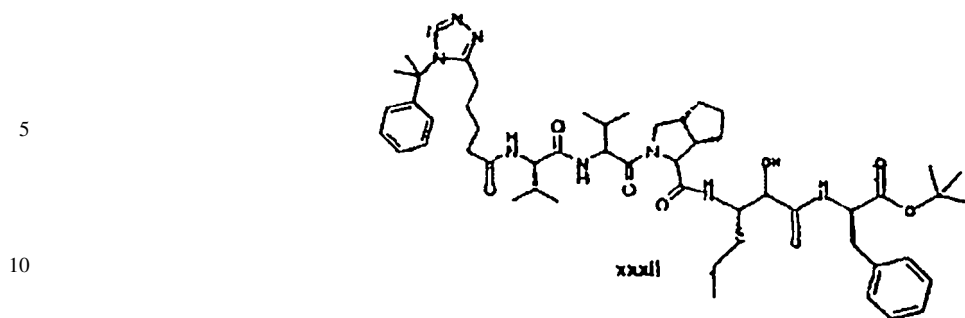
Ejemplo Intermedio 31 - compuesto xxxi

El compuesto xxx (1,02 g, 1,57 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agita durante una noche. El metanol se retira por evaporación y el residuo se disuelve en agua y se neutraliza con 2 ml de HCl. Después de la extracción con EtOAc, se produce 1,00 g (~100%) del compuesto xxxi.



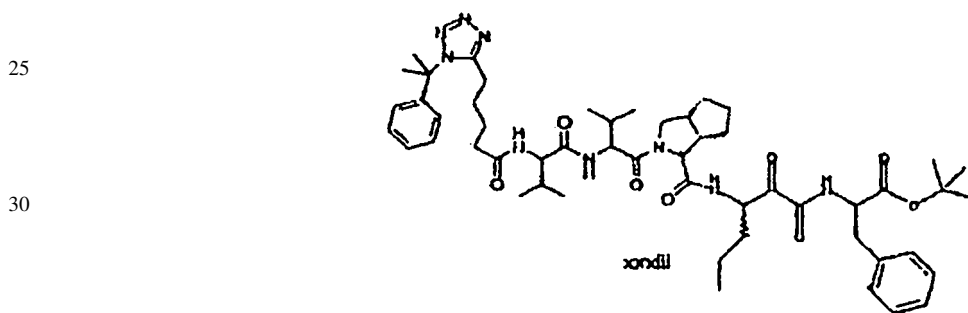
Ejemplo Intermedio 32 - compuesto xxxii

El compuesto xxxi (300 mg, 0,48 mmol) y PyBop (300 mg, 0,58 mmol) se disuelven en 10 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto x (201 mg, 0,58 mmol) y después se añade DIPEA (104 μ l). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml y se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ y tres veces con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 100%), produciendo 450 mg (98%) del compuesto xxxii.



15 Ejemplo Intermedio 33 - compuesto xxxiii

20 El compuesto xxxii 360 mg (0,38 mmol) se disuelve en 8 ml de DCM y se añaden 240 mg (0,57 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 50 ml y se lava tres veces con salmuera. El producto se purifica por cromatografía en columna (etanol al 25%/EtOAc), produciendo 300 mg (83%) del compuesto xxxiii,

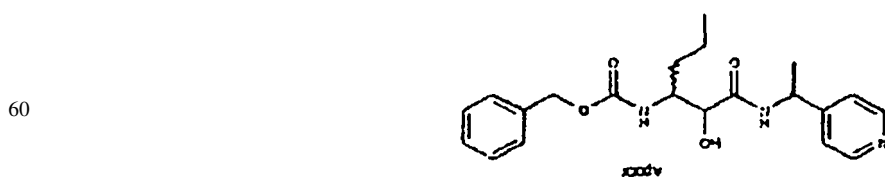


35 Ejemplo Intermedio 34 - compuesto xxxiv

40 A una solución en DCM (10 ml) de xxxv (790 mg, 2,80 mmol) se le añaden PyBop (1,7 g, 3,36 mmol)



50 y Hobbit (450 mg, 3,36 mmol). La solución resultante se enfría a 0°C y se trata con una solución en DCM (3 ml) de (s)- α -(4-piridil)etilamina (410 mg, 3,36 mmol). Esto se sigue de la adición de DIPEA (0,5 ml, 3,36 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. En este momento, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc. Todo se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), proporcionando 630 mg (58%) del compuesto xxxiv,

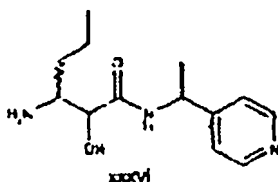


65 Nota: la (s)- α -(4-piridil)etilamina se obtiene de su sal D-tartrato por lavado con una base (NaOH 1 N) y posterior extracción con EtOAc. La tasa de recuperación es del 89%.

ES 2 325 481 T3

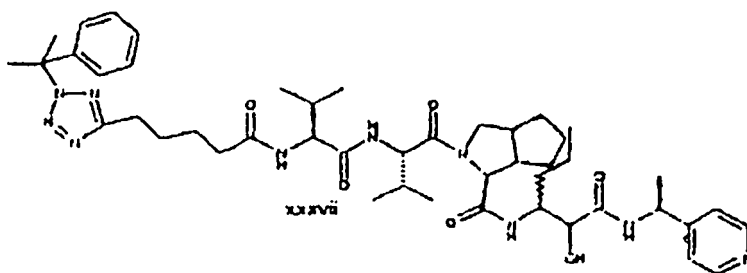
Ejemplo Intermedio 35 - compuesto xxxvi

A una solución en metanol (15 ml) del compuesto xxxiv (630 mg, 1,64 mmol) se le añade en atmósfera de N₂ Pd/C (150 mg, contenido de paladio al 10%). La reacción se agita en atmósfera de H₂ durante una noche. La mezcla
5 de reacción se filtra a través de una capa de Celite® 521. Los filtrados se concentran al vacío, proporcionando 420 mg (~100%) del compuesto xxxvi.



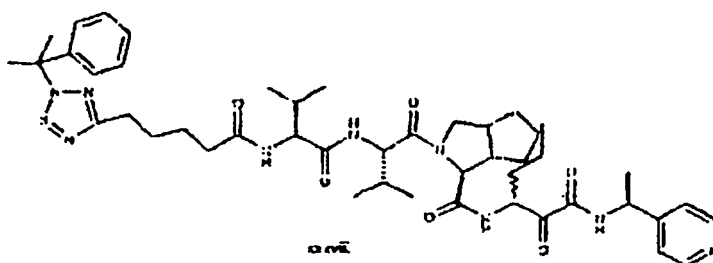
Ejemplo Intermedio 36 - compuesto xxxvii

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto xxxi (270 mg, 0,43 mmol) se le añade PyBop (270 mg, 0,52 mmol). Esto se sigue de la adición del compuesto xxxvi (160 mg, 0,64 mmol) y DIPEA (0,09 ml, 0,52 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc y se lava con HCl 0,1 N, seguido de NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se
25 concentra, dando el compuesto xxxvii (masa total de 430 mg) para la siguiente etapa



Ejemplo Intermedio 37 - compuesto xxxviii

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto xxxvii (370 mg, 0,43 mmol) se le añade reactivo de DMP (280 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se interrumpe con Na₂SO₃ al 10%. Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), proporcionando 180 mg (49% en 2 etapas) del
50 compuesto xxxviii.

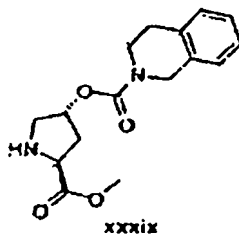


ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 38 - compuesto xxxx

El compuesto xxix (2,5 g, 5 mmol) se disuelve en 40 ml de DCM. A la solución se le añaden 5,1 ml de una solución 1 M de DCC en THF. A la mezcla se le añaden 1,08 g (3,53 mmol) del compuesto xxxix. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche.

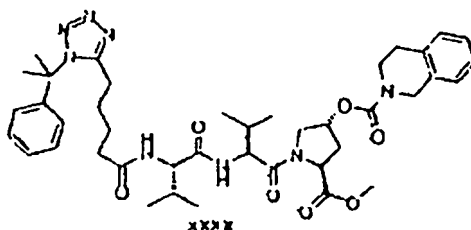
10



15

La mezcla se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml, se lava secuencialmente con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera y después se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 80%/hexano), produciendo 2,59 g (95%) del compuesto xxxx,

20



25

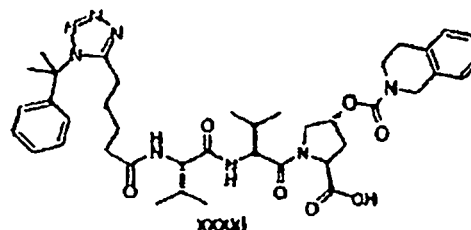
30

Ejemplo Intermedio 39 - compuesto xxxxi

El compuesto xxxx (2,59 g, 3,35 mmol) se disuelve en 20 ml de MeOH y se añaden 4 ml de NaOH acuoso 1 N.. La mezcla se agita durante una noche y después se evapora por rotación, dejando un residuo. El residuo se disuelve en agua y se neutraliza con EtOAc, produciendo 2,49 g (~100%) del compuesto xxxxi,

35

40



45

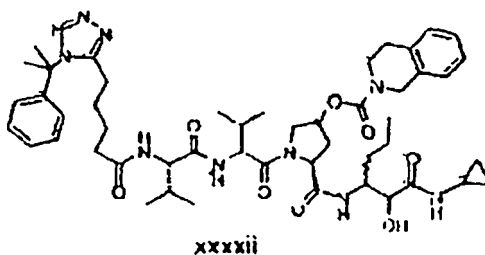
Ejemplo Intermedio 40 - compuesto xxxxii

El compuesto xxxxi (847 mg, 1,16 mmol) y 724 mg (1,39 mmol) de PyBop se disuelven en 10 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto xiii (260 mg, 1,39 mmol) y después se sigue de la adición de DIPEA (209 μ l). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml y se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ y tres veces con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna (etanol al 5%/EtOAc), produciendo 930 mg (86%) del compuesto xxxxii,

50

55

60

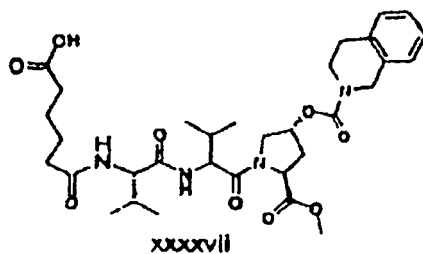


65

ES 2 325 481 T3

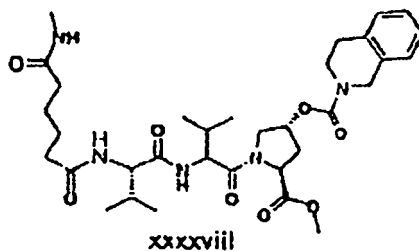
Ejemplo Intermedio 44 - compuesto xxxvii

El compuesto xxxvi (4,57 g, 6,65 mmol) se disuelve en 10 ml de TFA y 10 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se retira al vacío y el residuo se disuelve en 50:50 de acetonitrilo/agua y se liofiliza, produciendo el compuesto xxxvii en forma de un polvo



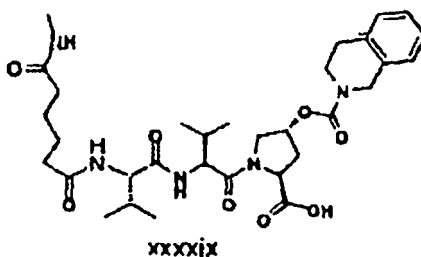
Ejemplo Intermedio 45 - compuesto xxxviii

El compuesto xxxvii (1 g, 1,59 mmol) y 990 mg (2,28 mmol) de PyBop se disuelven en 20 ml de DCM y se añaden 1,6 ml de metilamina 1 M en THF. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera. El residuo se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOH al 10%/EtOAc), produciendo 1 g (98%) del compuesto xxxviii,



Ejemplo Intermedio 46 - compuesto xxxix

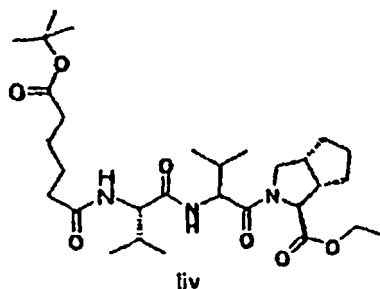
El compuesto xxxviii (1 g, 1,55 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH 1 N. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retira por evaporación. El residuo se disuelve en agua, se neutraliza y se extrae con EtOAc, produciendo 960 mg (98%) del compuesto xxxix.



ES 2 325 481 T3

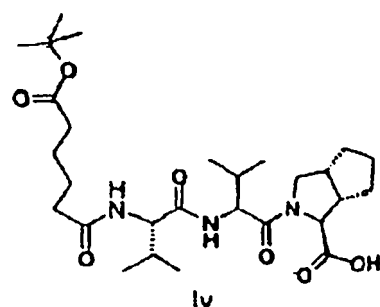
Ejemplo Intermedio 50 - compuesto liv

El compuesto xxxv (755 mg, 1,88 mmol) y 255 mg (1,88 mmol) de HOAt se disuelven en 20 ml de DCM y se añaden 1,88 ml de DCCDCM 1 M. A la mezcla de reacción se le añade el compuesto v (288 mg) y la mezcla de reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en EtOAc y se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 80%/Hexanos), produciendo 800 mg (90%) del compuesto liv,



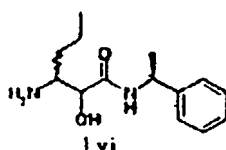
Ejemplo Intermedio 51 - compuesto Iv

El compuesto liv (800 mg, 1,41 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retira al vacío y el residuo se disuelve en agua y se neutraliza con 2 ml HCl 1 N. El producto se extrae con EtOAc. La evaporación del disolvente de extracción produce 760 mg (~100%) de Iv,

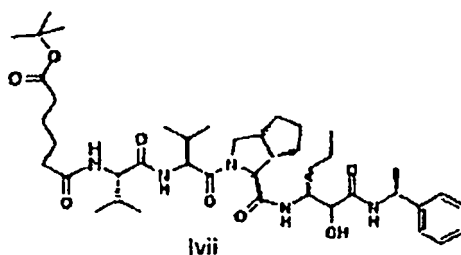


Ejemplo Intermedio 52 - compuesto lvii

El compuesto Iv (760 mg, 1,41 mmol) y 880 mg (1,69 mmol) de PyBop se disuelven en 5 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto lvi (530 mg, 2,12 mmol) y se añade



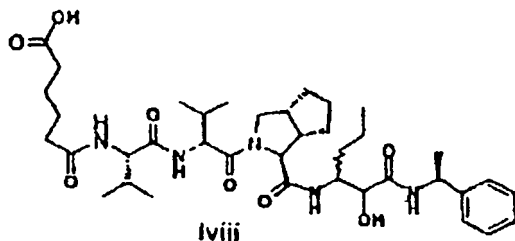
DIPEA. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera y después se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 100%), produciendo 870 mg (80%) del compuesto lvii,



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 53 - compuesto lviii

El compuesto lvii (350 mg, 0,45 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y 5 ml de DCM y la mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación y el producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 220 mg (69%) del compuesto lviii.



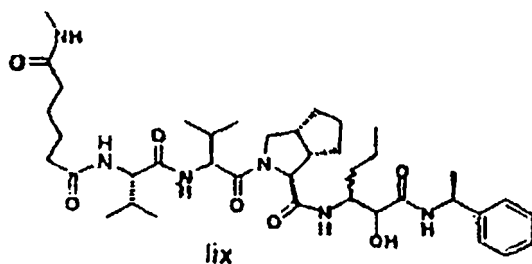
10

15

Ejemplo Intermedio 54 - compuesto lix

El compuesto lviii (200 mg, 0,28 mmol) y 218 mg (0,42 mmol) de PyBop se disuelven en 5 ml de DCM. Se añade metilamina (0,28 ml de 2 M en THF). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluye con EtOAc hasta alcanzar un volumen de 100 ml, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera y después se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 15%/EtOAc), produciendo 168 mg (79%) de lix,

25



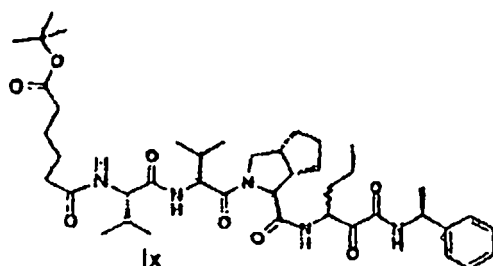
30

35

Ejemplo Intermedio 55 - compuesto lx

El compuesto lviii (200 mg, 0,26 mmol) se disuelve en 4 ml de DCM y se añaden 165 mg (0,39 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación. El residuo se disuelve en acetonitrilo al 30%/agua, se filtra y se purifica por RP-HPLC, produciendo 140 mg (70%) del compuesto lx,

45



50

55

Ejemplo Intermedio 56 - compuesto ii

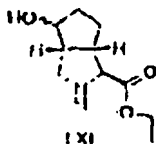
Una solución en DCM (30 ml) y EtOH (30 ml) del compuesto i (4 g, 12,1 mmol), en atmósfera de N₂ se enfría a -10°C. Se añade NaBH₄ (458 mg, 12,1 mmol) y la solución se agita a -10°C durante 50 minutos. El análisis por TLC (EtOAc al 50%/Hexano) muestra la conversión total en una mancha de realización más lenta. La reacción se interrumpe cuidadosamente con hielo y después con una solución fría saturada de NH₄Cl (10 ml). La mezcla se vierte en DCM (300 ml). La fase orgánica se lava una vez con una solución saturada de NH₄Cl (60 ml) y dos veces con salmuera (60 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y se concentra al vacío, produciendo 3,5 g del compuesto ii (87%).

65

ES 2 325 481 T3

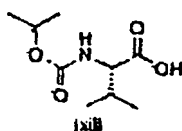
Ejemplo Intermedio 57 - compuesto lxi

En un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un globo de H₂, una solución etanólica (50 ml) del compuesto ii (3,5 g, 10,5 mmol) se somete a condiciones de hidrogenación convencionales [Pd(OH)₂ al 20%/C (147 g, 2, mmol)] durante 5 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. El catalizador se retira por filtración a través de Celite y se lava con DCM. Después, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo 2 g (96%) del compuesto lxi.

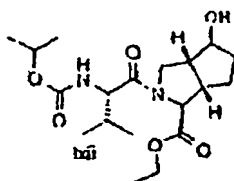


Ejemplo Intermedio 58 - compuesto lxii

En una atmósfera inerte, una solución del compuesto lxi (200 mg, 1 mmol), el compuesto lxiii,

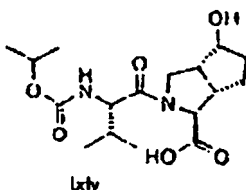


(233 mg, 1,1 mmol) y HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) (156 mg, 1,15 mmol) en DMF anhidra (6 ml) se agita durante 20 minutos. Después, la temperatura se disminuye hasta 0°C, seguido de la adición de DIC (0,18 ml, 1,15 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. La solución se diluye con EtOAc y después se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y con salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. El residuo se limpia por cromatografía (gel de sílice: EtOAc al 70%/DCM), dando el compuesto lxii con un rendimiento del 45%.



Ejemplo Intermedio 59 - compuesto lxiv

Una solución del compuesto lxii (777 mg, 2 mmol) en dioxano (6 ml) y NaOH 0,5 M (6 ml) se agita durante 5 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. El examen por TLC (EtOAc al 100%) muestra la conversión completa en una mancha al principio. La reacción se enfría con un baño de hielo seguido de la adición de HCl 1 N (4 ml). Después, se añade NaCl sólido y toda la mezcla se extrae dos veces con EtOAc (2 x 150 ml). Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida, dando el compuesto lxiv con un rendimiento del 92%.

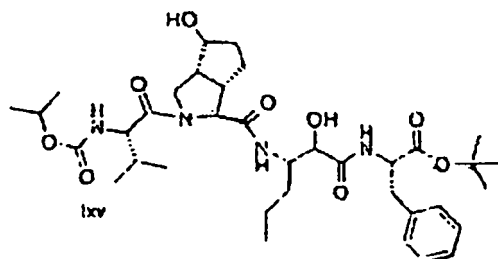


Ejemplo Intermedio 60 - compuesto lxv

En una atmósfera inerte, una solución del compuesto x (203 mg, 0,58 mmol), el compuesto lxiv (276 mg, 0,775 mmol) y HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) (126 mg, 0,93 mmol) en DMF anhidra (6 ml) se agita durante 20 minutos. Después, la temperatura se disminuye hasta 0°C, seguido de la adición de DIC (0,14 ml, 0,93 mmol). La reacción

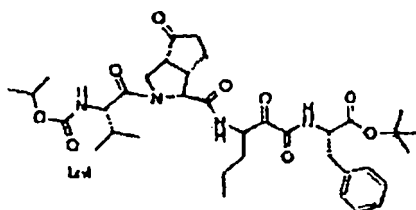
ES 2 325 481 T3

se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. La solución se diluye con EtOAc y después se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía (gel de sílice: de EtOAc al 50%/DCM a 80:19:1 de EtOAc/DCM/MeOH), dando el compuesto lxxv con un rendimiento del 62%.



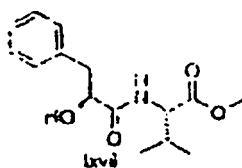
Ejemplo Intermedio 61 - compuesto lxxvi

En una atmósfera inerte, a una solución del compuesto lxxv (287 mg, 0,42 mmol) en DCM anhidro (15 ml) se le añade el reactivo CMP (605 mg, 1,43 mmol). La reacción se agita durante 2 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. (Nota - La duplicación de la cantidad de reactivo de DMP y el tiempo de reacción se realiza para garantizar que los dos grupos alcohol se oxidan completamente para dar los grupos ceto correspondientes). El examen por TLC (gel de sílice: MeOH al 2%/EtOAc) muestra la completa conversión en el producto más rápido. La reacción se diluye con DCM (150 ml) y después se lava dos veces con una solución acuosa al 10% de sulfito sódico (2 x 50 ml), dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y con salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía (gel de sílice: de EtOAc al 50%/DCM a 80:19:1 de EtOAc/DCM/MeOH), dando el compuesto lxxvi con un rendimiento del 77%.



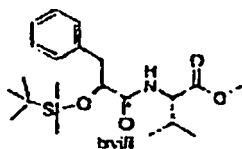
Ejemplo Intermedio 62 - compuesto lxxvii

A una solución en DCM (60 ml) de ácido L-3 fenil láctico (2 g, 12 mmol) se le añade PyBOP (7,5 g, 14,4 mmol). A esta solución se le añade una solución en DCM (20 ml) que contiene éster metílico de L-valina HCl (2,4 g, 14,4 mmol) y DIPEA (2,6 ml, 14,4 mmol). La mezcla de reacción resultante se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc (30 ml) y se lava con NaHCO₃ (30 ml) y salmuera (15 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 50%/Hex sobre gel de sílice, dando 2,97 g (89%) del compuesto lxxvii,



Ejemplo Intermedio 63 - compuesto lxxviii

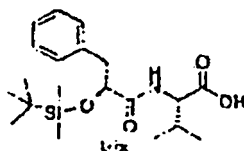
El compuesto lxxvii (2,97 g, 10,6 mmol) se recoge en DCM (50 ml) y se enfría con un baño de hielo. A esta solución se le añade TBSCl (2,1 g, 13,8 mmol) seguido de imidazol (0,94 g, 13,8 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. Después, la reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 20%/Hexano sobre gel de sílice, dando 3,79 g (90%) del compuesto lxxviii,



ES 2 325 481 T3

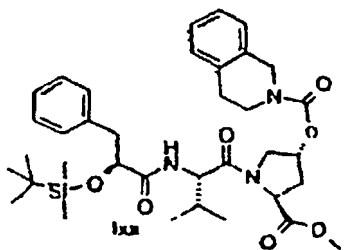
Ejemplo Intermedio 64 - compuesto *lxix*

A una solución en metanol (50 ml) del compuesto *lxviii* (3,78 g, 9,6 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (14,4 ml, 14,4 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. El disolvente se retira parcialmente al vacío. Después, el pH de la mezcla de reacción se disminuye hasta 3 usando una solución acuosa 1 N de HCl. La solución se diluye con EtOAc y salmuera. El producto deseado se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, dando 3,5 g (96%) del compuesto *lxix*.



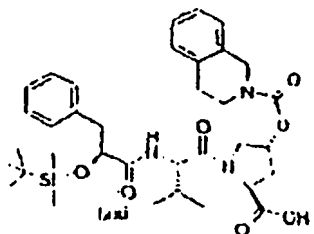
Ejemplo Intermedio 65 - compuesto *lxx*

A una solución en DCM (15 ml) que contiene el compuesto *lxix* (1,1 g, 2,9 mmol) se le añade HOAt 20 (0,44 g, 3,2 mmol) seguido de una solución 1 M de DCC (13,2 ml, 3,2 mmol) en DCM. Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, se añade una solución en DCM (15 ml) del compuesto *xxxix* (970 mg, 3,2 mmol). Esta reacción se agita durante una noche en atmósfera de N₂. Después, la reacción se diluye con EtOAc (30 ml), se filtra a través de una capa de gel de sílice y se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra al vacío. La purificación se realiza en EtOAc al 50%/Hex sobre gel de sílice, dando 1,5 g (77%) del compuesto *lxx*,



Ejemplo Intermedio 66 - compuesto *lxxi*

A una solución en metanol (30 ml) del compuesto *xx* (1,5 g, 2,4 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (3,6 ml, 3,6 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. En este momento, el disolvente se retira parcialmente y el pH de la mezcla de reacción se ajusta a 3 usando HCl acuoso 1 N. Después, la reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y salmuera (20 ml). La fase acuosa se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, proporcionando 1,3 g (92%) del compuesto *lxxi*,



ES 2 325 481 T3

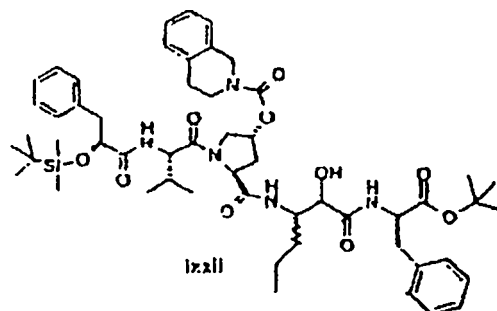
Ejemplo Intermedio 67 - compuesto lxxii

A una solución de DCM (2 ml) que contiene el compuesto lxxi (180 mg, 0,28 mmol) se le añaden PyBOP (175 mg, 0,34 mmol) y DIPEA (0,06 ml, 0,34 mmol), seguido de una solución en DCM (3 ml) del compuesto x (150 mg, 0,41 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. Después, la reacción se diluye con EtOAc (30 ml) y se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 100% sobre gel de sílice, dando 270 mg (98%) del compuesto lxxii,

10

15

20



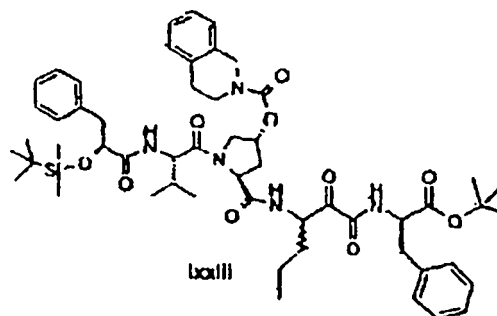
Ejemplo Intermedio 68 - compuesto lxxiii

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto lxxii (270 mg, 0,27 mmol) se le añade reactivo de DMP (140 mg, 0,33 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1,5 horas, la reacción se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (10 ml). La reacción se diluye con EtOAc (30 ml) y se agita durante 10 minutos. La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 60%/Hex., dando 150 mg (56%) del compuesto lxxiii,

30

35

40



Ejemplo Intermedio 69 - compuesto lxi

A una solución en etanol (50 ml) del compuesto ii (3,5 g, 10,5 mmol) se le añade, en una atmósfera de nitrógeno, Pd(OH)₂C (1,47 g, contenido del Pd al 20%, 2,1 mmol). La reacción se somete a hidrogenación a una presión de 1 atm. Después de que se complete, los catalizadores se filtran a través de una capa de Celite y se lavan con diclorometano. Los filtrados se concentran al vacío, dando 2 g (96%) del compuesto lxi.

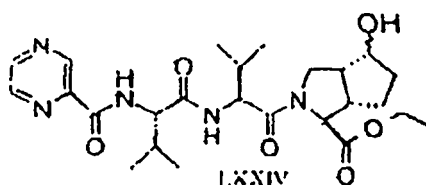
50

Ejemplo Intermedio 70 - compuesto lxxiv

A una solución en DMF (60 ml) del compuesto vii (9,1 g, 28,2 mmol) se le añaden HOAt (4 g, 29,4 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (3,7 g, 29,4 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en DMF (10 ml) del compuesto lxi (5,1 g, 25,6 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, los sólidos de color blanco se retiran por filtración. Los filtrados se concentran al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, dando 9,5 g (67%) del compuesto lxxiv,

60

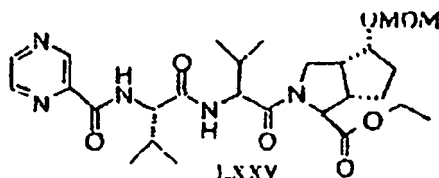
65



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 71 - compuesto lxxv

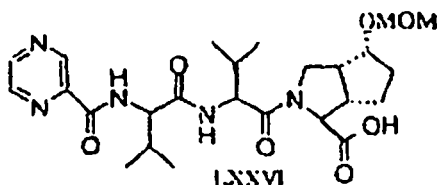
A una solución del compuesto lxxiv (1,5 g, 3 mmol) en THF anhidro (25 ml) se le añade $\text{Et}_3\text{Pr}_2\text{N}$ (0,78 ml, 4,5 mmol) aproximadamente a la temperatura ambiente. La mezcla se enfría a 0°C y se añade gota a gota MOMCl (1,5 ml, 19,7 mmol). La reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante una noche. Después, la solución se diluye con éter y se lava con agua (3 veces). Las fases acuosas se extraen adicionalmente con éter y todas las fases orgánicas se secan sobre MgSO_4 antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. El isómero deseado del compuesto lxxv se aísla por cromatografía sobre gel de sílice (5/2 de EtOAc/Hexanos)



con un rendimiento del 40% con separación limpia de los diastereómeros.

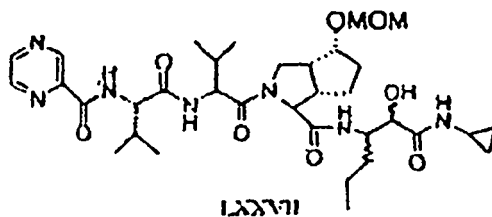
Ejemplo Intermedio 72 - compuesto lxxvi

A una solución del compuesto lxxv (502 mg, 0,9 mmol) en EtOH (5 ml) se le añade gota a gota NaOH acuoso 2 N (0,9 ml, 1,8 mmol) a 0°C . La reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante una noche. Después de que se complete la saponificación, la solución se acidifica a pH 3 con resina ácida Dowex 50W8X-200. Los sólidos se retiran por filtración y el filtrado resultante se concentra al vacío, dando un residuo oleoso que se liofiliza, dando 370 mg (80%) del compuesto lxxvi.



Ejemplo Intermedio 73 - compuesto lxxvii

Una solución en diclorometano (4 ml) del compuesto lxxvi (110 mg, 0,21 mmol) se trata con PyBOP (200 mg, 0,38 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla de reacción se carga con una solución en THF (3,2 ml) del compuesto xiii (60 mg, 0,32 mmol), seguido de $\text{Et}_3\text{Pr}_2\text{N}$. Después de agitar durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO_4 , antes de concentrarse para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 143 mg (100%) del compuesto lxxvii,

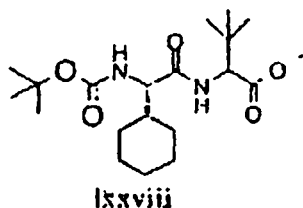


Ejemplo Intermedio 74 - compuesto lxxviii

A una solución en THF (50 ml) de H-Chg-OH 2 (5 g, 19,4 mmol) se le añaden HOBt (2,63 g, 19,4 mmol) y EDCI (3,72 g, 19,4 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en THF (19 ml) y DMF (10 ml) que contiene clorhidrato de éster metílico de

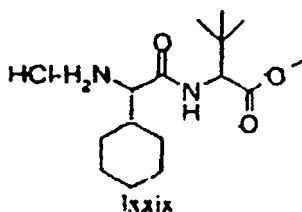
ES 2 325 481 T3

tert-L-Leucina (19,4 mmol) y DIPEA (6,75 ml, 38,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento acuoso convencional y la cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 15 - 20%/Hexanos) producen 2,27 g (30%) del compuesto lxxviii.



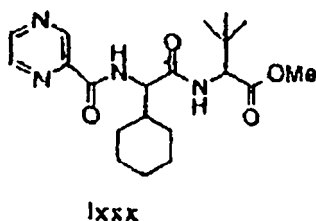
15 Ejemplo Intermedio 75 - compuesto lxxix

A una solución en THF (12 ml) del compuesto lxxviii (2,27 g, 5,91 mmol) se le añade una solución 4 N de HCl en dioxano (7,38 ml, 29,5 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo el compuesto lxxix que se usa directamente para la siguiente reacción.



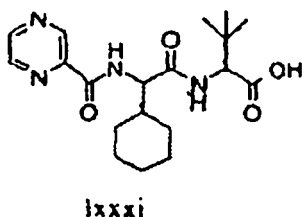
35 Ejemplo Intermedio 76 - compuesto lxxx

Una solución en THF del compuesto lxxix (5,9 mmol) se añade a una solución en THF (20 ml) que contiene ácido 2-pirazinacarboxílico (878 mg, 7,08 mmol), HOBt (957 mg, 7,08 mmol) y EDCI (1,36 g, 7,08 mmol). Después, a la mezcla resultante se le añade DIPEA (2,05 ml, 11,8 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío, proporcionando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40-50%/Hexanos), proporcionando 1 g (36%) del compuesto lxxx,



55 Ejemplo Intermedio 77 - compuesto lxxxi

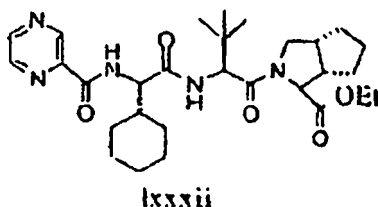
A una solución en metanol (20 ml) del compuesto lxxx (1 g, 2,56 mmol) se le añade NaOH 2 N 3,2 ml, 6,4 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se acidifica a pH 3 usando HCl 5 N.. La reacción se diluye con EtOAc (75 ml) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se disuelve en 1:1 de CH₃CN/H₂O para la liofilización. Se obtiene un total de ~1 g (100%) del compuesto lxxxi.



ES 2 325 481 T3

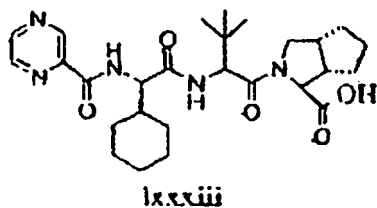
Ejemplo Intermedio 78 - compuesto lxxxii

Una solución en diclorometano (10 ml) del compuesto lxxxii (2,56 mmol) se trata con HOAt (348 mg, 2,56 mmol) y DCC (2,56 ml, 1 M, 2,56 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (5 ml) del compuesto v (2,56 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, los sólidos de color blanco (urea) se retiran por filtración. Los filtrados se concentran al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, proporcionando 1,4 g (100%) del compuesto lxxxii.



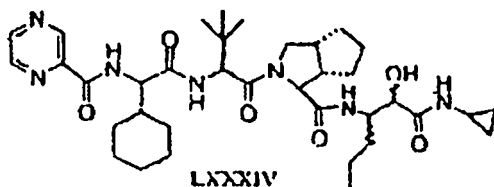
Ejemplo Intermedio 79 - compuesto lxxxiii

Una solución en etanol (15 ml) del compuesto lxxxii (1,4 g, 2,58 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,58 ml, 5,17 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con resina ácida. Los sólidos se retiran por filtración. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, dando un residuo que se liofiliza, dando 1,32 g (~100%) del compuesto lxxxiii,



Ejemplo Intermedio 80 - compuesto lxxxiv

Una solución en diclorometano (15 ml) del compuesto lxxxiii (360 mg, 0,7 mmol) se trata con PyBOP (582 mg, 1,12 mmol). Después de agitar aproximadamente a la temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto xiii (195,6 mg, 1,05 mmol), seguido de DIPEA (0,25 ml, 1,40 mmol). Después de agitar durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3%/EtOAc), produciendo 420 mg (88%) del compuesto lxxxiv,

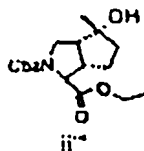


Ejemplo Intermedio 81 - compuesto ii'''

Una mezcla de diclorometano anhidro y éter (20 ml:20 ml) se enfría a -78°C en atmósfera de N_2 (g). A la solución se le añade TiCl_4 (1 M en diclorometano, 10 ml, 10 mmol) y después se añade MeLi (1,4 M en éter, 7,1 ml, 10 mmol) con agitación durante 30 minutos más a -78°C . A la mezcla se le añade gota a gota una solución del compuesto i (2 g, 6 mmol) en 10 ml de diclorometano a la misma temperatura durante 15 minutos. La solución se calienta lentamente a -40°C durante 10 minutos y después se agita a 0°C durante 2 horas. La reacción se interrumpe vertiendo la mezcla

ES 2 325 481 T3

en una mezcla de agua/éter (1:1) y después las fases se dejan separar. La fase acuosa se extrae adicionalmente dos veces con éter. Todas las fases orgánicas se lavan con agua y salmuera y se secan sobre $MgSO_4$ antes de concentrarse para dar un aceite de color amarillo. El compuesto ii''' deseado se aísla por cromatografía sobre gel de sílice (2/1 de EtOAc/Hexanos) con un rendimiento del 83%



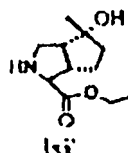
5

10

15 Ejemplo Intermedio 82 - compuesto lxi'

Al compuesto ii''' (1,7 g, 5 mmol) se le añade Pd al 10% en peso sobre C (0,53 g, 0,5 mmol), seguido de la adición de MeOH (17 ml). Se pasa gas hidrógeno a través de la mezcla de reacción y el gas hidrógeno se mantiene para la reacción a 1 atm durante una noche. Después, la mezcla de reacción se filtra y se concentra, dando 929 mg (87%) del compuesto lxi' en forma de un aceite incoloro.

20



25

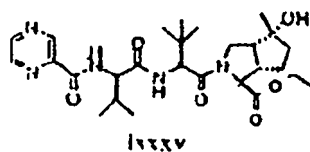
30

Ejemplo Intermedio 83 - compuesto lxxxv

A una solución en THF (16 ml) del compuesto xxii (1 g, 3 mmol) se le añade aproximadamente a la temperatura ambiente HOAt (0,41 g, 3 mmol) seguido de una solución 1 M en DCC de diclorometano (3 ml, 3 mmol). Después de agitar durante 30 minutos aproximadamente a la temperatura ambiente, al ácido activado con HOAt anterior se le añade una solución en diclorometano (6 ml) del compuesto lxi'. La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se filtra a través de Celite. El filtrado se diluye con EtOAc (120 ml) y se lava con agua y después con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, dando un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 100%), produciendo 1 g (65%) del compuesto lxxxv.

35

40



45

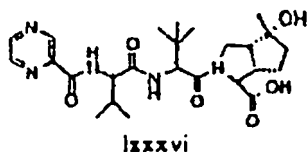
50

Ejemplo Intermedio 84 - compuesto lxxxvi

A una solución en etanol (8 ml) del compuesto lxxxv (920 mg, 1,7 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (1,7 ml, 3,4 mmol). La reacción se agita durante una noche aproximadamente a la temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 con resina ácida Dowex. Los sólidos se retiran por filtración y el filtrado se concentra, dando un aceite incoloro, que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH_3CN/H_2O y se liofiliza, proporcionando 800 mg (93%) del compuesto lxxxvi. El análisis por HPLC muestra un solo pico de producto.

55

60

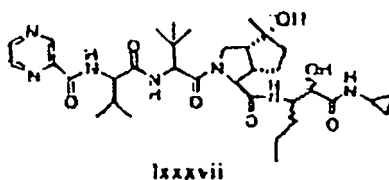


65

ES 2 325 481 T3

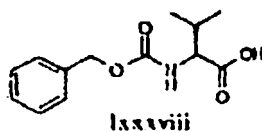
Ejemplo Intermedio 85 - compuesto lxxxvii

A una solución en diclorometano (4 ml) del compuesto lxxxvi (150 mg, 0,3 mmol) se le añade PyBOP (250 mg, 0,47 mmol). La solución se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (4,5 ml) del compuesto xiii (84 mg, 0,45 mmol) seguido de Et₃N (0,1 ml, 0,6 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 200 mg (100%) del compuesto lxxxvii,

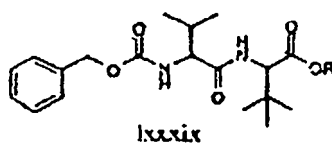


Ejemplo Intermedio 86 - compuesto lxxxix

El compuesto lxxxviii, N-Cbz-L-Valina, (2,5 g, 9,9 mmol) se recoge en THF (30 ml).

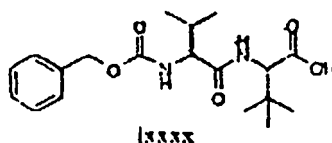


Se añaden EDCI (2,29 g, 11,9 mmol) y HOBT (1,62 g, 11,9 mmol) y la mezcla se agita durante cinco minutos. Se añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-Leucina (2,17 g, 11,9 mmol) en THF (23,9 ml) seguido de DIPEA (2,1 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo y se lava con HCl 1 N, bicarbonato sódico saturado y salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra. El residuo concentrado se purifica en acetato de etilo al 25%/hexano, produciendo 1,1 g (29%) del compuesto lxxxix,



Ejemplo Intermedio 87 - compuesto lxxxx

El compuesto lxxxix se hidroliza en condiciones convencionales usando alcohol metílico (0,3 M) y NaOH 1 N (1,5 equiv.), produciendo 1,03 g (95%) del compuesto lxxxx,



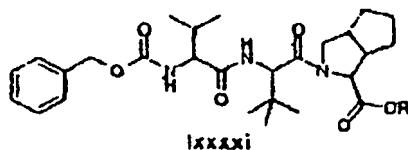
Ejemplo Intermedio 88 - compuesto lxxxxi

El compuesto lxxxx (385 mg, 1,06 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade DCC (1,4 mmol) seguido de HOAt (190 mg, 1,4 mmol). Después, se añade el compuesto v (260 mg, 1,4 mmol) en diclorometano (3 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La reacción se diluye con acetato de etilo, se

ES 2 325 481 T3

filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo se purifica en acetato de etilo al 50%/hexano, produciendo 440 mg (80%) del compuesto lxxxxi,

5

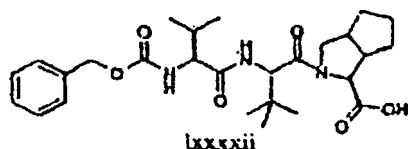


10

Ejemplo Intermedio 89 - *compuesto lxxxxii*

El compuesto lxxxxi se hidroliza en condiciones convencionales usando alcohol etílico (0,3 M) y NaOH 1 N (1,5 equiv.), produciendo 390 mg del compuesto lxxxxii,

15

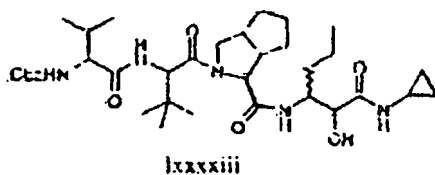


20

Ejemplo Intermedio 90 - *compuesto lxxxxiii*

El compuesto lxxxxii (350 mg, 0,7 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade PyBOP 15 (480 mg, 0,91 mmol) seguido del compuesto xiii (170 mg, 0,91 mmol). Se añade DIPEA (0,16 ml, 0,91 mmol) y mezcla de reacción se agita durante una noche. La mezcla de reacción se concentra y se purifica en acetato de etilo al 100%, produciendo 420 mg (90%) del compuesto lxxxxiii,

30

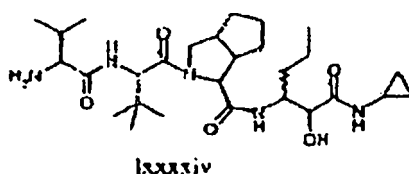


35

Ejemplo Intermedio 91 - *compuesto lxxxxiv*

El compuesto lxxxxiii se hidrogena usando Pd al 10%/C (1% en mol) en alcohol metílico en atmósfera de hidrógeno, produciendo 335 mg (100%) del compuesto lxxxxiv.

40



45

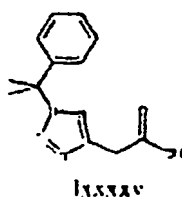
50

Ejemplo Intermedio 92 - *compuesto lxxxxv*

Se recoge 1H-tetrazol-5-acetato de etilo (5 g, 32 mmol) en cloroformo (80 ml). Se añade ácido tricloroacético (12,03 g, 73,65 mmol) seguido de alfa metil estireno (3,78 g, 32 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche. Al día siguiente, la solución se diluye con acetato de etilo y se lava con KOH al 10% y salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra, produciendo 8 g (96%) del tetrazol-5-acetato de etilo N-prottegido correspondiente. Este material se somete a condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol etílico (0,3 M) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo 7 g (99%) del compuesto lxxxxv.

55

60

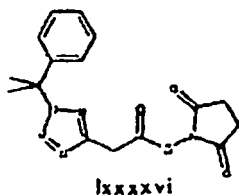


65

ES 2 325 481 T3

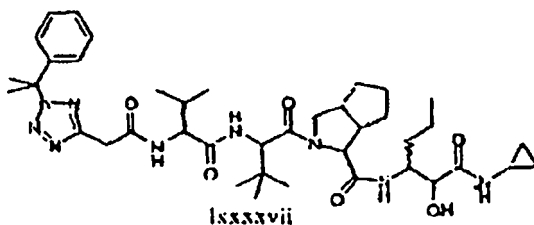
Ejemplo Intermedio 93 - compuesto lxxxxvi

El compuesto lxxxxv (3,62 g, 14,7 mmol) se recoge en diclorometano (50 ml). Se añaden EDCI (4,32 g, 22,1 mmol) y DIPEA (5,1 ml, 29,4 mmol) y se agita durante cinco minutos. Se añade N-hidroxi succinimida (3,38 g, 29,4 mmol) y se agita durante tres horas. La reacción se diluye con diclorometano y se lava tres veces con agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra, produciendo 3,66 g (73%) del compuesto lxxxxvi,



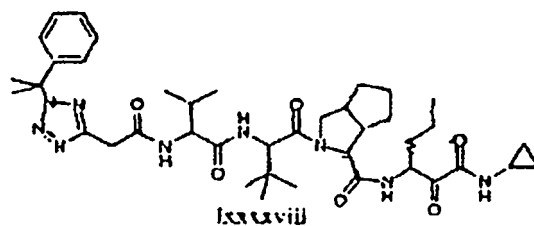
Ejemplo Intermedio 94 - compuesto lxxxvii

El compuesto lxxxxiv (335 mg, 0,62 mmol) y el compuesto lxxxxvi (343 mg, 1 mmol) se recogen en diclorometano (6 ml). Se añade DIPEA (0,17 ml, 1 mmol) y mezcla de reacción se agita durante una noche. La reacción se diluye con acetato de etilo, se lava con bicarbonato sódico saturado y salmuera y se concentra. El residuo se purifica en alcohol etílico al 5%/acetato de etilo, dando 80 mg (16%) del compuesto lxxxvii,



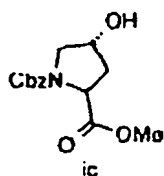
Ejemplo Intermedio 95 - compuesto lxxxviii

El compuesto lxxxvii (80 mg, 0,11 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade reactivo de DMP (55 mg, 0,13 mmol) y se agita durante una hora. La mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo y se interrumpe con una solución al 10% de sulfito sódico. La fase orgánica se lava con bicarbonato sódico saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra y el residuo resultante se purifica en acetato de etilo al 100%, produciendo 40 mg (48%) del compuesto lxxxviii,



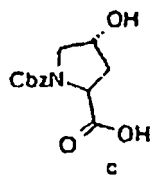
Ejemplo Intermedio 96 - compuesto xxxix

Se prepara el compuesto ic, éster metílico de N-Cbz-4-Hidroxi Pro, (2,1 g, 7,9 mmol)

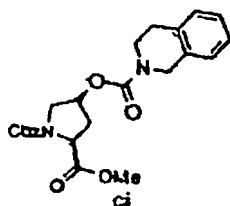


ES 2 325 481 T3

con rendimiento cuantitativo a partir del compuesto c, N-Cbz-4-hidroxi Pro), se disuelve en DCM



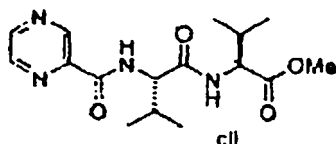
(25 ml), a la solución se le añaden CDI (1,54 g, 9,5 mmol) y DIPEA (1,7 ml, 9,5 mmol) y se agita durante 10 minutos. A la mezcla de reacción se le añade gota a gota 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (TIQ) (1,2 ml, 9,5 mmol) y se agita durante cinco horas. La fase orgánica se lava con agua, HCl 1 N y salmuera. Después de la concentración de las fases orgánicas, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 40%/Hexanos, produciendo el compuesto ci, éster metílico de N-Cbz-4-TIQcarboniloxi-Pro, (2,5 g, 75%).



El compuesto ci (2,5 g, 5,9 mmol) se disuelve en MeOH (75 ml). La solución se lava abundantemente con N₂ y se añade Pd/C (al 10%, 300 mg). La mezcla de reacción se lava abundantemente con H₂ y se agita durante una noche. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra, produciendo el compuesto xxxix, 4-(TIQ-carboniloxi)-Pro, éster metílico, (1,49 g, 83%).

Ejemplo Intermedio 97 - compuesto vii

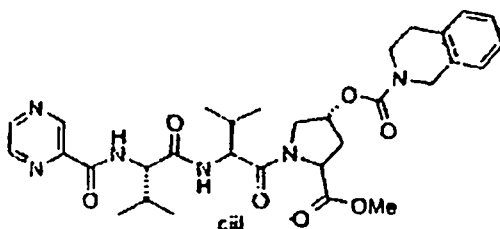
El compuesto cii, éster metílico de N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val, (10,9 g, 32,4 mmol)



se disuelve en THF (80 ml) y después se añade NaOH acuoso (48,6 ml, 48,6 mmol). La mezcla resultante se agita 48 horas y después se añade más cantidad de NaOH (16,3 ml, 16,3 mmol) y la mezcla se calienta a 40°C durante tres horas. Después, el pH de la mezcla de reacción se disminuye hasta 3 y la fase acuosa se extrae con EtOAc y después se concentra, produciendo el compuesto vii en bruto, ácido N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val (10,6 g, 100%).

Ejemplo Intermedio 98 - compuesto ciii

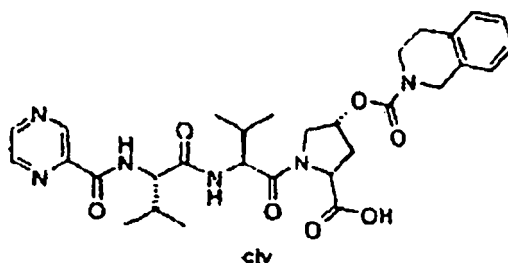
El compuesto cii (4,1 g, 12,7 mmol) se disuelve en DCM (20 ml). A esta solución se le añaden HOAt (1,73 g, 12,7 mmol) y DCC (12,7 mmol) y la solución se agita durante una hora. A la mezcla de reacción se le añade el compuesto xxxix (3,22 g, 10,6 mmol) en DCM (10 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc del 50% al 80%/Hexanos), produciendo el compuesto ciii, éster metílico de N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val-4-(TIQ carboniloxi)-Pro, (5,27 g, 81,7%).



ES 2 325 481 T3

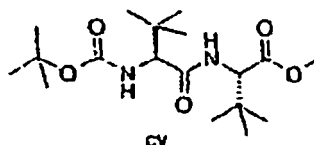
Ejemplo Intermedio 99 - compuesto *civ*

El compuesto *ciii* (650 mg, 1,29 mmol) se disuelve en THF (5 ml). A la solución se le añade NaOH acuoso (1,42 ml, 1,42 mmol) y después se agita durante una noche. El pH de la solución se disminuye hasta 3 y la fase orgánica se aísla y se concentra, produciendo un residuo. El residuo se purifica usando HPLC de fase inversa en acetonitrilo/agua, produciendo el compuesto *civ*, ácido N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val-4-(TIQ carboniloxi)-Pro, (600 mg, 95%).



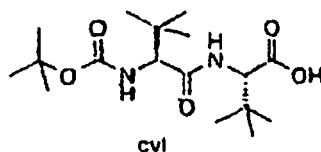
Ejemplo Intermedio 100 - compuesto *cv*

Se combinan N-Boc-L-*tert*-Leucina (2,3 g, 10 mmol) y clorhidrato de éster metílico de L-*tert*-Leucina (2 g, 11 mmol) en DMF (30 ml). Después, a la solución se le añade HOAt (1,6 g, 11,5 mmol). La mezcla resultante se agita durante 20 minutos en atmósfera de N₂ y después se disminuye su temperatura hasta 0°C, después de lo cual se añaden DIC (1,8 ml, 11,5 mmol) y 2,4,6-colidina (1,45 ml, 11 mmol). La solución resultante se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con un gradiente de EtOAc al 20% - 30%/hexanos, produciendo el compuesto *cv* (3,3 g, 92%).



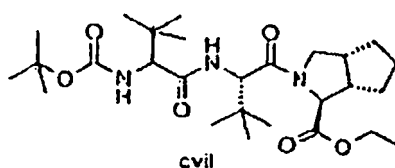
Ejemplo Intermedio 101 - compuesto *cvi*

El compuesto *cv* (3,3 g, 9,2 mmol) se hidroliza usando dioxano (40 ml) y NaOH 0,5 N (37 ml, 18,4 mmol), produciendo el compuesto *cvi* (2,9 g, 92%).



Ejemplo Intermedio 102 - compuesto *cvii*

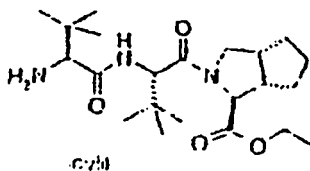
El compuesto *cvi* (2 g, 5,8 mmol) y el compuesto *v* (1 g, 5,5 mmol) se disuelven en DMF (20 ml). Después, a la solución se le añaden HOAt (832 mg, 6,6 mmol) y DIC (1,1 ml, 6,6 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con un gradiente de EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto *cvii* (2,4 g, 81%).



ES 2 325 481 T3

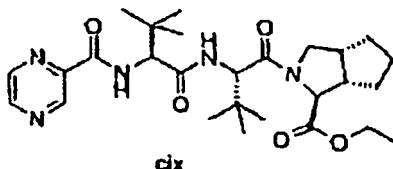
Ejemplo Intermedio 103 - compuesto cviii

El compuesto cvii (2,4 g, 4,72 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). A la solución se le añade TFA (10 ml). La solución resultante se agita durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra, se disuelve en EtOAc y después la fase orgánica se lava con NaOH 1 N y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cviii (1,084 g, 56,1%).



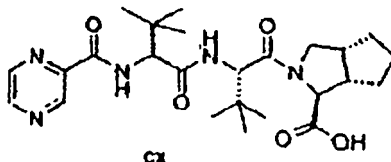
Ejemplo Intermedio 104 - compuesto cix

Se disuelven ácido 2-pirazinacarboxílico (181 mg, 1,46 mmol) y el compuesto cviii (541 mg, 1,325 mmol) en DMF (15 ml). A la solución se le añaden HOAt (207 mg, 1,52 mmol) y DIC (0,24 ml, 1,52 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con un gradiente de EtOAc al 20%-30%-35%/hexanos, produciendo el compuesto cix (430 mg, 63%).



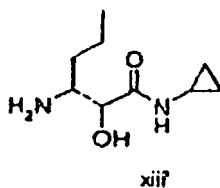
Ejemplo Intermedio 105 - compuesto cx

El compuesto cix se hidroliza usando EtOH (7 ml) y NaOH 1 N (4,7 ml, 4,7 mmol), produciendo el compuesto cx (700 mg, 91,6%).



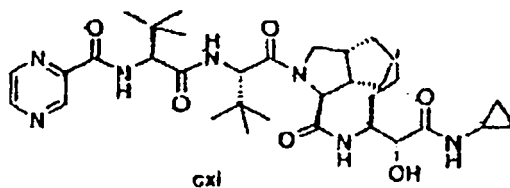
Ejemplo Intermedio 106 - compuesto cxi

El compuesto cx (690 mg, 1,42 mmol) se disuelve en DCM (9 ml). Después, a la solución se le añade PyBOP (890 mg, 1,7 mmol), seguido de la adición de Compuesto xiii' (320 mg,



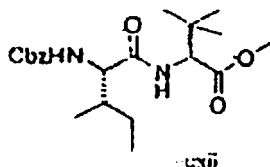
1,7 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,3 ml, 1,7 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de N₂. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cxi (490 mg, 52,7%).

ES 2 325 481 T3

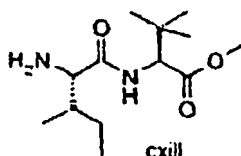


10 Ejemplo Intermedio 107 - compuesto cxiv

El compuesto cxii (1,2 g, 3,06 mmol) se disuelve en MeOH (12 ml). Después del lavado abundante y minucioso

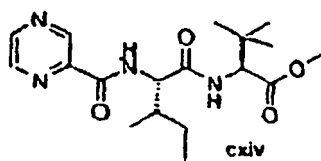


20 con N₂, se añade Pd(OH)₂ al 10% en peso sobre carbono (0,6 g) y la mezcla se hidrogena durante una noche, después de lo cual se muestra la mezcla de reacción completa por TLC (EtOAc al 30%/hexanos). La solución se aísla del material sólido por filtración y se concentra, dando el compuesto desprotegido correspondiente cxiii en forma de un



30 que se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional.

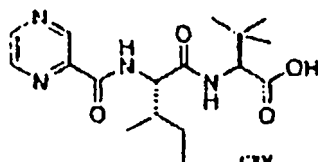
35 Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (400 mg, 3,2 mmol, 1,1 equiv.) en DCM/THF (4 ml/4 ml) y después se añaden HOAt (440 mg, 3,2 mmol) y DCC (343 ml, 1 M en DCM). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, el compuesto cxiii (0,96 g, 3,2 mmol) obtenido previamente se disuelve en DCM (6,4 ml) y se añade a la



45 produciendo un sólido de color blanco (0,8 g, 80%).

50 Ejemplo Intermedio 108 - compuesto cxv

55 El compuesto cxiv (0,8 g, 2,2 mmol) se disuelve en MeOH (10 ml) y después se añade NaOH 2 N (ac.) (3,3 ml, 6,6 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual se indica que la mezcla de reacción se ha completado por TLC (EtOAc al 50%/hexanos). Se realiza la acidificación a pH 3 con HCl 5 N y se diluye con EtOAc, seguido de extracción de la fase orgánica. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxv (0,74, 95%) después de la concentración.

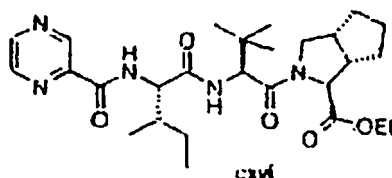


ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 109 - compuesto cxvi

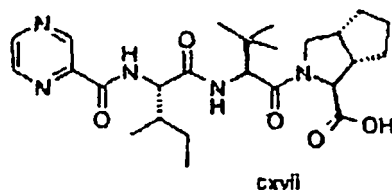
A una solución en DCM (6 ml) del compuesto cxv (0,74 g, 2,1 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (290 mg, 2,1 mmol), seguido de la adición de una solución 1 M de DCC en DCM (2,2 ml, 2,2 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, al ácido activado con HOAt anterior se le añade una solución en THF (10,5 ml, 0,2 M) del compuesto v (2,1 mmol).

La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la mezcla de reacción se filtra a través de celite. El filtrado se diluye con EtOAc (120 ml) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, dando un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/hexanos), produciendo el compuesto cxvi (0,714 g, 66%).



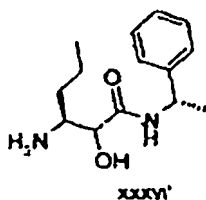
Ejemplo Intermedio 110 - compuesto cxvii

A una solución en EtOH del compuesto cxvi (0,7 g, 1,4 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (2 ml, 4 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente, después se acidifica a pH 3 con HCl 5 N y se diluye con EtOAc, seguido de extracción de la fase orgánica. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxvii (95%) después de la concentración.

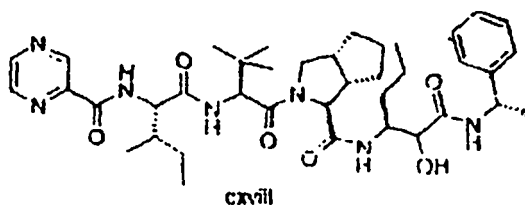


Ejemplo Intermedio 111 - compuesto cxviii

A una solución en DCM/THF (10 ml/2 ml) del compuesto cxvii (300 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (416 mg, 0,8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xxxvi' (200 mg, 0,8 mmol), seguido de DIPEA



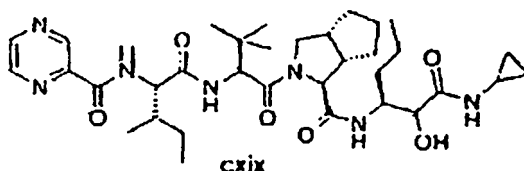
(0,22 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3-5%/EtOAc) produce el compuesto cxviii (335 mg, 76%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 112 - compuesto cxix

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto cxvii (340 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (470 mg, 0,9 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (170 mg, 0,9 mmol), seguido de DIPEA (0,24 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3-5%/EtOAc) produce el compuesto cxix (164 mg, 36%).

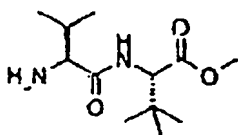


Ejemplo Intermedio 113 - compuesto xx

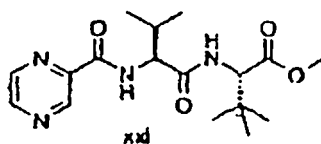
Se disuelve N-Cbz-L-Valina (6,28 g, 25 mmol) en DCM (30 ml). A esta solución se le añaden HOBt (3,38 g, 25 mmol) y DCC (25 ml, solución 1 M) y se agita durante cinco minutos. A esta mezcla se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-Leucina metil (25 ml, solución 1 M) y se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. El residuo se purifica cromatográficamente con EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto xx (2,96 g, 31%).

Ejemplo Intermedio 114 - compuesto xxi

El compuesto xx (2,95 g, 7,8 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (800 mg) en MeOH (40 ml) en atmósfera de H₂, produciendo la amina libre correspondiente que se muestra a continuación (1,9 g, 100%).

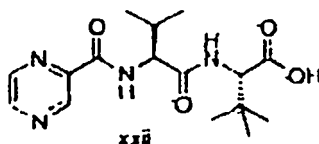


Se disuelve ácido 2-pirazina-carboxílico (970 mg, 7,8 mmol) en DCM (20 ml). A esta solución se le añade PyBOP (4,06 g, 7,8 mmol). A la solución se le añade la amina libre (1,9 g, 7,8 mmol) en DCM (15 ml) y después se añade DIPEA (1,36 ml, 7,8 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica cromatográficamente con EtOAc al 30%-40%/Hexanos, produciendo el compuesto xxi (2,07 g, 75,8%).



Ejemplo Intermedio 115 - compuesto xxii

El compuesto xxi se hidroliza usando MeOH (20 ml) y NaOH 1 N (3-equiv.), produciendo el compuesto xxii (1,82 g, 93,9%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 116 - compuesto xxiii

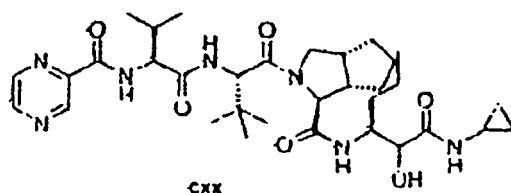
El compuesto xxii (895 mg, 2,66 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). A la solución se le añade DCC (3,2 mmol) y después se añade HOAt (435 mg, 3,2 mmol). Después, se añade el compuesto v (3,2 mmol) en THF (16 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 50%/hexanos, produciendo el compuesto xxiii (730 mg, 54,8%).

10 Ejemplo Intermedio 117 - compuesto xxiv

El compuesto xxiii se hidroliza usando EtOH (5 ml) y NaOH 1 N (1,5 equiv.) para producir el compuesto xxiv (690 mg, 100%).

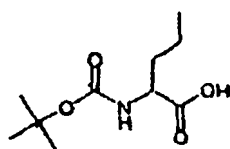
15 Ejemplo Intermedio 118 - compuesto cxx

El compuesto xxiv (245 mg, 0,52 mmol) se disuelve en DCM (3 ml). A la solución se le añade PyBOP (330 mg, 0,62 mmol) y después se añade el compuesto xiii' (120 mg, 0,62 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,11 ml, 0,62 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica cromatográficamente con EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto cxx (220 mg, 60%).

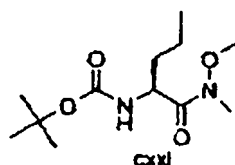


35 Ejemplo Intermedio 119 - compuesto xiii'

Se disuelve Boc-NVA-OH (24,96 g, 114,9 mmol) en THF (200 ml). A la solución se le añade en porciones CDI (22,35,



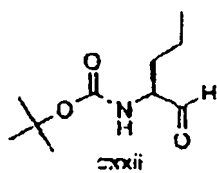
137,8 mmol) y la solución se agita durante 30 minutos. Se disuelve clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (12,33 g, 126,4 mmol) en DMF (50 ml) y después a la solución se le añade DIPEA (22 ml, 126,4 mmol). La solución de DMP se deja en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se añade a una solución de THF. La mezcla resultante se agita durante el fin de semana en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentra al vacío hasta alcanzar un volumen total de 100 ml. Esta fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxi en bruto (25,3 g).



Se añade LAH (107,3 mmol) a un matraz de fondo redondo seco de 1 l en atmósfera de N₂ en una solución 1 M de Et₂O. Esta solución se disminuye hasta 0°C y después se añade gota a gota el compuesto cxxi (97,5 mmol) en Et₂O (100 ml). Después de que se complete la adición, la mezcla resultante se agita durante 30 minutos. La mezcla de reacción se inactiva a 0°C mediante la adición lenta de EtOAc (50 ml), seguido de la adición lenta de una solución al 5% de KHSO (50 ml). Esta mezcla se agita durante 30 minutos. La fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxii en bruto (22,28 g).

ES 2 325 481 T3

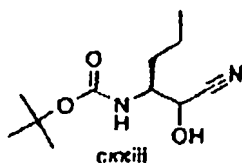
5



10

El compuesto cxxii se disuelve en MeOH (100 ml). Se disuelve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (16,82 g, 96,6 mmol) en agua (100 ml) y después se añade a la solución del compuesto cxxii a 0°C. Esta mezcla se almacena en el frigorífico (5°C) durante una noche. A la mezcla de reacción se le añade KCN (7,53 g, 115,9 mmol) en agua (100 ml) y se agita durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El compuesto se extrae con EtOAc (3 x 100 ml). La fase orgánica se lava con salmuera (3 x 50 ml), se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra, produciendo el compuesto cxxiii en bruto (15,86 g).

15

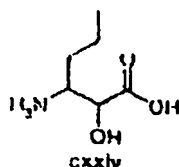


20

25

El compuesto cxxiii (15,86 g) se disuelve en dioxano (100 ml). A esta solución se le añade HCl concentrado (al 37%, 100 ml) seguido de anisol (10 ml) y se establece calentamiento a reflujo (110°C). La reacción se agita durante 1,5 horas. Cuando la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y el disolvente se retira al vacío, produciendo una pasta seca. El residuo se seca durante una noche a alto vacío, produciendo el compuesto cxxiv en bruto.

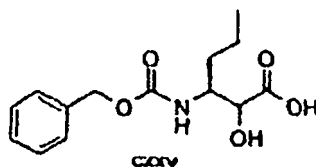
30



35

El compuesto cxxiv (69,6 mmol) se disuelve en DMF (60 ml) y THF (60 ml). A la mezcla se le añade N-(benciloxicarbonilo)succinimida (17,33 g, 69,6 mmol), seguido de la adición de DIPEA (12,1 ml, 69,6 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de N_2 . La mezcla se concentra a un volumen reducido (50 ml) y se diluye con EtOAc. La fase orgánica se lava con HCl 0,1 N (2 x 100 ml) y salmuera, produciendo el compuesto cxxv (17,5 g, 54,2% en cinco etapas).

40

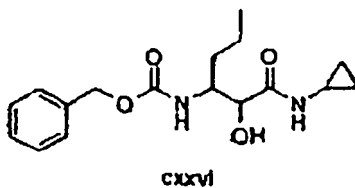


45

50

El compuesto cxxv (5,66 g, 20,14 mmol) se disuelve en DCM (60 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (12,57 g, 24,2 mmol) y HOBt (3,27 g, 24,2 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se disminuye hasta 0°C y después se añaden ciclopropilamina (1,67 ml, 24,2 mmol) y DIPEA (4,2 ml, 24,2 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con HCl 0,1 N, NaHCO_3 saturado y salmuera. Después, la fase orgánica se concentra y se purifica cromatográficamente usando EtOAc al 70%/Hexanos, produciendo el compuesto cxxvi (3,18 g, 49,3%).

55

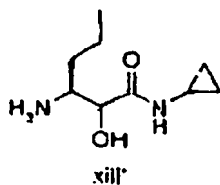


60

65

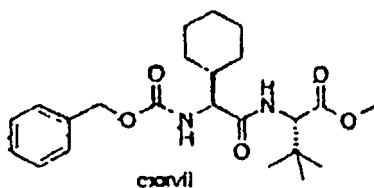
El compuesto cxxvi (3,18 g, 9,94 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (600 mg) en MeOH (70 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de H_2 , se filtra a través de celite y se concentra, produciendo el compuesto xiii' en bruto (2,1 g, 100%).

ES 2 325 481 T3



10 Ejemplo Intermedio 120 - compuesto cxxvii

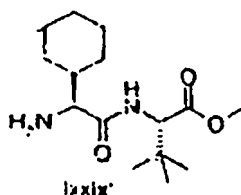
15 Se disuelve N-Cbz-L-Ciclohexilglicina (3 g, 10,3 mmol) en DCM (36 ml). A esta solución se le añaden HOAt (1,5 g, 11,28 mmol) y DCC (11,28 ml, 11,28 mmol) y se agita durante cinco minutos. A esta mezcla se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-Leucina (103 ml, solución 1 M, 10,3 mmol) y se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite, se aclara con EtOAc y se concentra para dar un residuo que se purifica cromatográficamente usando EtOAc al 20% - 30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxvii (2,2 g, 52%).



25

Ejemplo Intermedio 121 - compuesto lxxix'

30 El compuesto cxxvii (2,2 g, 5,2 mmol) se hidrogena usando Pd(OH)₂ al 20%/C (1 g) en MeOH (15 ml) en atmósfera de H₂, produciendo el compuesto lxxix' (1,4 g, 98%).



40

Ejemplo Intermedio 122 - compuesto lxxx

45 Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (360 mg, 2,9 mmol) en DCM (10 ml). A la solución se le añade PyBOP (1,81 g, 3,5 mmol). Después, a la solución se le añade el compuesto lxxix' (825 mg, 2,9 mmol) en THF (10 ml), seguido de la adición de DIPEA (0,5 ml, 2,9 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. El residuo resultante de la concentración de la fase orgánica se purifica cromatográficamente con EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto lxxx (780 mg, 69%).

50

Ejemplo Intermedio 123 - compuesto lxxxi

55 El compuesto lxxx se hidroliza usando MeOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto lxxxi (615 mg, 81,8%).

Ejemplo Intermedio 124 - compuesto lxxxii

60 El compuesto lxxxi (610 mg, 1,6 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). Después, a la solución se le añade DCC (1,94 ml, 1,94 mmol), seguido de la adición de HOAt (270 mg, 1,94 mmol). Después, a la solución se le añade el compuesto v (1,94 mmol) en THF (19,4 ml). La mezcla resultante se agita durante dos noches en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 40%/hexanos, produciendo el compuesto lxxxii (450 mg, 83,4%).

65

ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 125 - compuesto lxxxiii

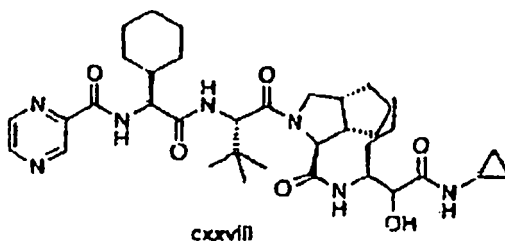
El compuesto lxxxi se hidroliza usando EtOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.) para producir el compuesto lxxxiii (650 mg, 99%).

5

Ejemplo Intermedio 126 - compuesto cxxviii

El compuesto lxxxiii (400 mg, 0,78 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (610 mg, 1,2 mmol), seguido del compuesto xiii' (230 mg, 1,2 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,2 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica cromatográficamente con un gradiente de EtOAc al 100% a EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto cxxviii (365 mg, 68,7%).

15



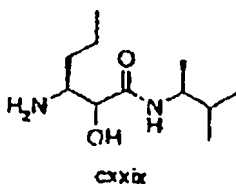
20

25

Ejemplo Intermedio 127 - compuesto cxxx

El compuesto lxxxiii (365 mg, 0,7 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (440 mg, 0,84 mmol), seguido de la adición del compuesto cxxix

30

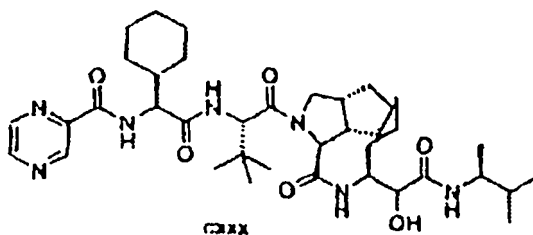


35

(0,84 mmol) en THF (8,4 ml). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,1 ml, 0,84 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cxxx (350 mg, 70%).

40

45



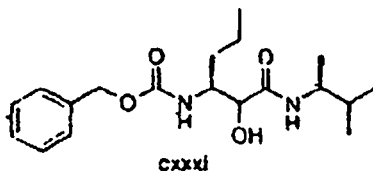
50

Ejemplo Intermedio 128 - compuesto cxxxi

El compuesto cxxv (2,54 g, 9,05 mmol) se disuelve en DCM (30 ml). A la solución se le añaden PyBOP (5,65 g, 10,9 mmol) y HOBt (1,47 g, 10,9 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se disminuye hasta 0°C, después de lo cual se añaden (S)-(+)-3-Metil-2-butilamina (1,27 ml, 10,9 mmol) y DIPEA (1,9 ml, 10,9 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La fase orgánica se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxi (1,44 g, 45,5%).

55

60

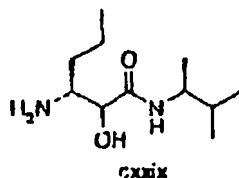


65

ES 2 325 481 T3

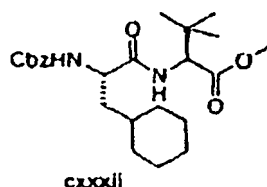
Ejemplo Intermedio 129 - compuesto cxxix

El compuesto cxxxi (1,3 g, 3,7 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y la fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxix en bruto (800 mg, 100%).

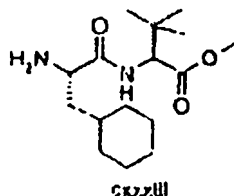


Ejemplo Intermedio 130 - compuesto cxxxi

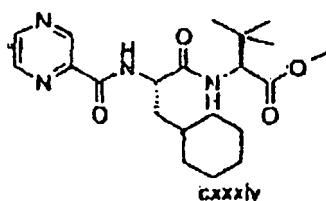
El compuesto cxxxi (1,6 g, 3,7 mmol) se disuelve en MeOH (12 ml). Después del lavado abundante y minucioso



con N₂, se añade Pd(OH)₂ al 10% en peso sobre carbono (0,74 g) y la mezcla se hidrogena durante una noche, después de lo cual se muestra una mezcla de reacción completa por TLC (EtOAc al 30%/hexanos). La solución se aísla del material sólido por filtración y se concentra, produciendo el compuesto cxxxi en forma de un aceite incoloro (100%) que se usa en la siguiente etapa



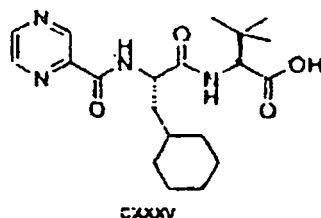
sin purificación adicional. Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (400 mg, 3,2 mmol, 1,1 equiv.) en DCM/THF (4 ml/4 ml) y después se añaden HOAt (440 mg, 3,2 mmol) y DCC (3,3 ml, 1 M en DCM). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, el compuesto cxxxi (0,96 g, 3,2 mmol) obtenido previamente se disuelve en DCM (6,4 ml) y se añade a la mezcla activada. Después de agitar durante 2 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra para dar un residuo que se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexanos), produciendo el compuesto cxxxi en forma de un sólido de color blanco (1,06 g, 83%).



ES 2 325 481 T3

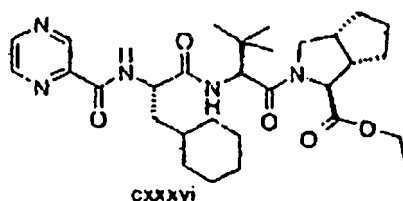
Ejemplo Intermedio 131 - compuesto cxxxv

El compuesto cxxxiv (1,06 g, 2,6 mmol) se disuelve en MeOH (10 ml) y después se añade NaOH 2 N (ac.) (4 ml, 8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual se indica que la hidrólisis se ha completado por TLC (EtOAc al 50%/hexanos). La solución se acidifica a pH 3 con HCl 5 N, se diluye con EtOAc y después la fase orgánica se extrae. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxxxv (100%) después de la concentración.



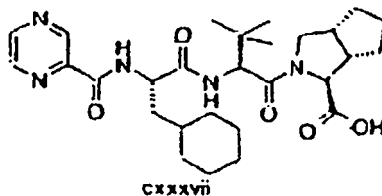
Ejemplo Intermedio 132 - compuesto cxxxvi

A una solución en DCM (8 ml) del compuesto cxxxv (1,44 g, 3,7 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (500 mg, 3,7 mmol), y después se añade una solución 1 M de DCC en DCM (3,7 ml, 3,7 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, al ácido activado con HOAt anterior se le añade una solución en THF (18,5 ml, 0,2 M) del compuesto (3,7 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se diluyen con EtOAc (120 ml) y se lavan con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, produciendo un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos), produciendo el compuesto cxxxvi (1 g, 71%).



Ejemplo Intermedio 133 - compuesto cxxxvii

A una solución en EtOH (8 ml) del compuesto cxxxvi (1 g, 1,8 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (2,7 ml, 5,4 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente, después se acidifica a pH 3 con HCl 5 N, se diluye con EtOAc y después la fase orgánica se extrae. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxxxvii (88%) después de la concentración.



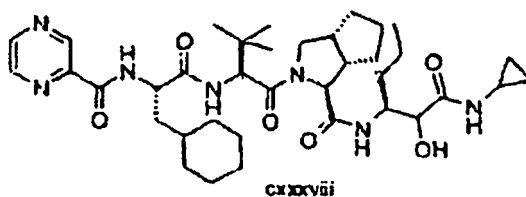
Ejemplo Intermedio 133 - compuesto cxxxviii

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto cxxxvii (350 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (450 mg, 0,86 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (160 mg, 0,86 mmol) seguido de DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después,

ES 2 325 481 T3

la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄ antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce el compuesto cxxxviii (407 mg, 88%).

5

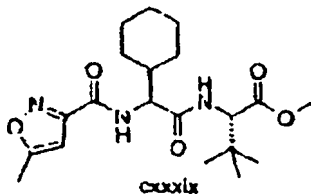


10

15 Ejemplo Intermedio 134 - compuesto cxxxix

Se disuelve ácido 5-metiloxazol-3-carboxílico (200 g, 2,05 mmol) en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (1,07 g, 2,05 mmol). A la solución se le añade el compuesto lxxix' (582 mg, 2,05 mmol) en DCM (5 ml), seguido de la adición de DIPEA (0,36 ml, 2,05 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, y el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxix (495 mg, 61,4%).

25

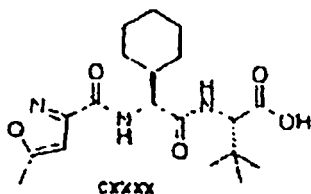


30

Ejemplo Intermedio 135 - compuesto cxxxx

35 El compuesto cxxxix se hidroliza usando MeOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto cxxxx (430 mg, 90%).

40

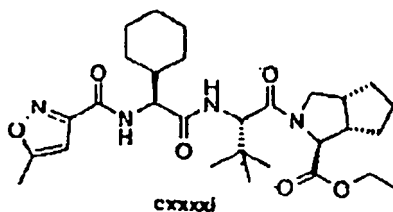


45

Ejemplo Intermedio 136 - compuesto cxxxxi

50 El compuesto cxxxx (380 mg, 1 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Después, a la solución se le añade DCC (1,2 mmol), seguido de la adición de HOAt (165 mg, 1,2 mmol). Después, se añade el compuesto v (1,2 mmol) en THF (12 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 35%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxxi (320 mg, 58%).

55



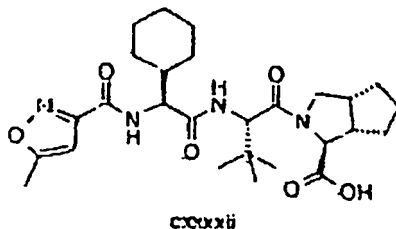
60

65

ES 2 325 481 T3

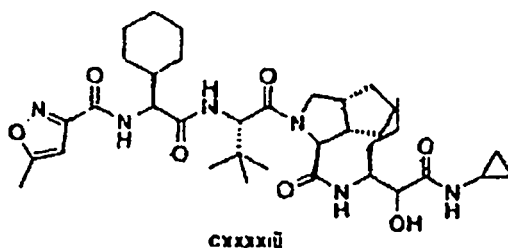
Ejemplo Intermedio 137 - compuesto cxxxxii

El compuesto cxxxxi se hidroliza usando EtOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto cxxxxii (730 mg, 94 3%).



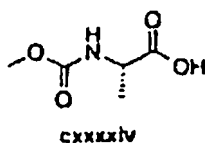
Ejemplo Intermedio 138 - compuesto cxxxxiii

El compuesto cxxxxii (240 mg, 0,46 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (295 mg, 0,56 mmol), seguido de la adición del compuesto xiii' (110 mg, 0,56 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,1 ml, 0,56 mmol). La mezcla de reacción se agita durante dos noches en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Después de la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica cromatográficamente con EtOAc al 90%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxxiii (168 mg, 53%).



Ejemplo Intermedio 139 - compuesto cxxxxiv

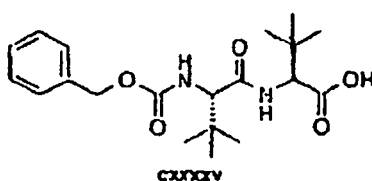
A una solución de NaOH (2 N, 42,1 ml, 84,2 mmol) a 5°C se le añade L-alanina (5,00 g, 56,1 15 mmol). Después de agitar durante 10 minutos, se añaden simultáneamente gota a gota cloroformiato de metilo (6,5 ml, 84,2 mmol) y NaOH (2 N, 42,1 ml, 84,2 mmol). La solución se agita en un baño de hielo durante 2 horas y después a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se lava con Et₂O (2 x 50 ml) y la fase acuosa se neutraliza a pH ~2 con HCl 5 N y se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). La fase orgánica extraída se lava con salmuera, se seca con MgSO₄ y se concentra para producir



el compuesto cxxxxiv, N-carbometoxi-L-alanina, (4,54 g, 54%) en forma de un aceite incoloro.

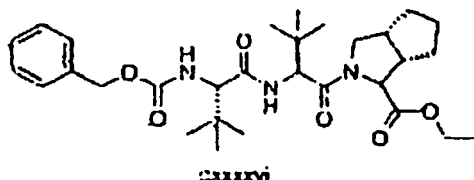
Ejemplo Intermedio 140 - compuesto cxxxxvi

Una solución del compuesto cxxxxv (3,57 g, 9,44 mmol) en THF a 5°C se trata con HOAt



ES 2 325 481 T3

(1,28 g, 9,44 mmol) y después se añade DCC (9,50 ml, 9,50 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 45 minutos, se añade una solución del compuesto v (104 ml, 10,4 mmol) en THF. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se enfría a 5°C y se interrumpe con NaHCO₃ saturado. Después de la filtración para retirar el DCU precipitado, la mezcla se disuelve en EtOAc (100 ml), se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera y después se seca con MgSO₄ y se concentra para dar un residuo que se purifica por cromatografía en columna de sílice (EtOAc al 25%/Hexanos), produciendo el compuesto cxxxxvi (2,91 g, 57%) en forma de una espuma gomosa.

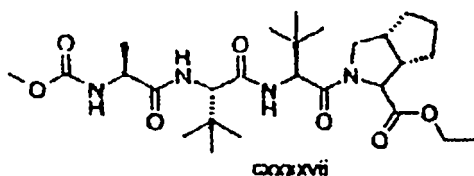


Ejemplo Intermedio 141 - compuesto cviii

A una solución del compuesto cxxxxvi en MeOH (25 ml) enfriada con un baño de hielo en una corriente de N₂ se le añade lentamente Pd/C. La mezcla se hidrogena a 1 atm durante una noche. El catalizador se retira por filtración y el filtrado se combina con 5 ml de DMF y se seca al vacío, produciendo el compuesto cviii.

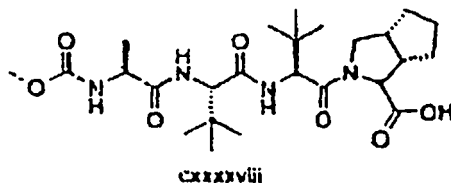
Ejemplo Intermedio 142 - compuesto cxxxxvii

Una solución del compuesto cxxxxiv (0,298 g, 2,03 mmol) y HOAt (0,276 g, 2,03 mmol) en THF enfriada en un baño de hielo se trata con DCC (2,05 ml, 2,05 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 0,5 horas, se añade una solución del compuesto cviii en THF y después se añade DIPEA (0,39 ml, 2,2 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche, después se enfría en un baño de hielo y se interrumpe con NaHCO₃ saturado. El DCU precipitado se filtra y el filtrado se disuelve en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera y después se seca con MgSO₄. Después de la retirada del disolvente orgánico, el residuo se purifica por cromatografía en columna de sílice (EtOAc al 60%/Hexanos), produciendo el compuesto cxxxxvii (0,47 g, 48%) en forma de una espuma gomosa.



Ejemplo Intermedio 143 - compuesto cxxxxviii

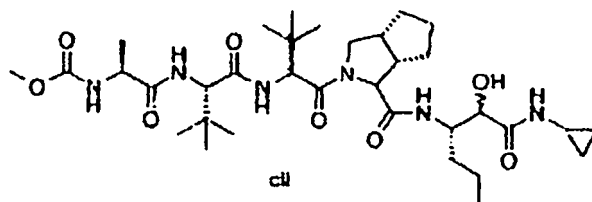
A una solución del compuesto cxxxxvii (0,47 g, 0,847 mmol) en EtOH (5 ml) a 5°C se le añade NaOH (2 N, 1,31 ml, 2,62 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se acidifica a pH ~2 con HCl (1 N) y el EtOH se retira por evaporación rotatoria. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y el extracto combinado se lava con salmuera y después se seca con MgSO₄. El disolvente se retira y el residuo se seca al vacío, produciendo el compuesto cxxxxviii (0,366 g, 82%) en forma de una espuma gomosa.



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 144 - compuesto cil

Una solución del compuesto cxxxxviii (0,366 g, 0,718 mmol) en DCM se enfría en un baño de hielo y se trata con PyBop (0,599 g, 1,15 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 horas, la mezcla se enfría con un
 5 baño de hielo y se trata con una solución del compuesto xiii' (0,200 g, 1,08 mmol) en THF y DIPEA (0,250 ml, 1,44 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con una solución de NH₄Cl. El disolvente se concentra y la mezcla se disuelve en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, y después se seca con MgSO₄. Después de la retirada del disolvente orgánico, el residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 5%/EtOAc), produciendo el compuesto cil (035 g, 72%)



Ejemplo Intermedio 145 - compuesto cxxi

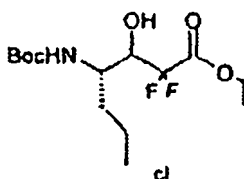
A una solución en THF (85 ml) de N-Boc-Nva-OH (compuesto 1) (8,68 g, 40 mmol) se le añade CDI (7,79 g, 48 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución anterior se trata con una solución en DMF (25 ml) que contiene clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (4,25 g, 44 mmol) y DIPEA (7,66 ml, 44 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se concentra al vacío. El residuo resultante se diluye con EtOAc (300 ml). Esta solución se lava secuencialmente con HCl 0,1 N (50
 30 ml), NaHCO₃ saturado (3 x 50 ml) y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos) para dar el compuesto cxxi (9,38 g, 94%).

Ejemplo Intermedio 1-16 - compuesto cxxii

A una solución en dietil Et₂O (50 ml) del compuesto cxxi (9,38 g, 31,9 mmol) enfriada a 0°C se le añade (lentamente) LAH (34,7 ml, 1 M, 34,7 mmol). La temperatura del matraz de reacción se mantiene por debajo de 5°C durante la adición de LAH. Después de que se complete la adición, a la reacción se le añade EtOAc (20 ml) para inactivar el exceso de LAH. Después, se añade gota a gota KHSO₄ acuoso (al 5%, 20 ml) con el fin de mantener la temperatura por debajo de 5°C. La fase orgánica se separa y después se lava secuencialmente con HCl 1 N (3 x 30 ml), NaHCO₃ saturado (3 x 30 ml) y salmuera. La fase orgánica se concentra y se seca al vacío, produciendo el compuesto cxxii en
 40 bruto (5,18 g, 69%).

Ejemplo Intermedio 147 - compuesto cl

A una suspensión en THF (25 ml) de Zn (2,75 g, 42 mmol) se le añaden a la temperatura de reflujo 0,2 ml de EtOC(O)CF₂Br. Esto se sigue de la adición lenta de una solución en THF (25 ml) del compuesto cxxii (3,05 g, 15,0 mmol) y EtOC(O)CF₂Br (4,84 ml, 37,5 mmol). Después de que se complete la adición de los dos reactivos, la mezcla de reacción se calienta a reflujo adicionalmente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se diluye con DCM (200 ml). La fase orgánica se lava con KHSO₄ 1 N. La fase orgánica se concentra y se seca al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/Hexano), produciendo el compuesto cl (2,78 g, 57%).

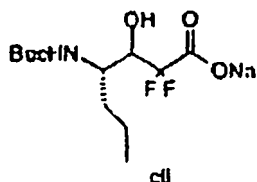


Esta preparación es esencialmente la misma que la descrita por Thaisrivongs y col., J. Med. Chem. 29, 2080-2087 (1986).

ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 148 - compuesto cli

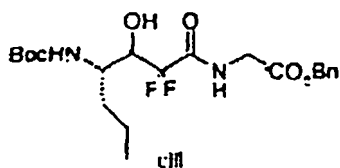
Una solución en THF (40 ml) del compuesto et (2,78 g, 8,53 mmol) se trata con NaOH 1 N (12,8 ml, 12,8 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, el disolvente se retira parcialmente al vacío. La mezcla de reacción restante se diluye con agua (50 ml) y se liofiliza, produciendo el compuesto cli en bruto (2,82 g, >100%) en forma de su sal sódica.



Esta preparación es esencialmente la misma que la descrita por Thaisrivongs y col., J. Med. Chem. 29, 2080-2087 (1986).

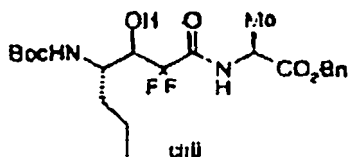
Ejemplo Intermedio 149 - compuesto clii

Una solución en DCM (10 ml) del compuesto cli en bruto (516 mg, 1,61 mmol) se trata con HOBt (436 mg, 3 mmol) y DIC (0,328 ml, 2,09 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en DCM (5 ml) que contiene sal TsOH de éster bencílico de glicina (815 mg, 2,42 mmol) y DIPEA (0,422 ml, 2,42 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, la mezcla de reacción se inactiva con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/hexanos), produciendo el compuesto clii (495 mg, 69%), ¹H RMN del compuesto clii (400 MHz, CDCl₃: δ 7,29-7,21 (m, 5H), 5,16 (s a, 2H), 4,89 (s a, 1H), 4,20-3,90 (m, 4H) 3,80 (s a, 1H), 1,75-1,42 (m, 4H), 1,38 (s, 9H), 0,87 (m, 3H).

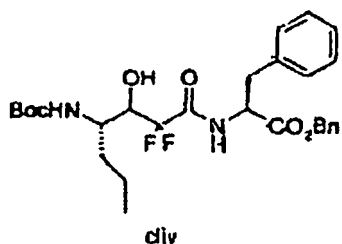


Partiendo del compuesto cli en bruto, se preparan los compuestos cliii (al 83%) y cliiv (al 50%) mediante un procedimiento idéntico al descrito para el compuesto clii.

¹H RMN del compuesto cliii (400 MHz, CDCl₃: δ 7,49 (s a, 1H), 7,34-7,24 (m, 5H), 5,13 (AB c, J = 12,2 Hz, J' = 23,9 Hz, 2H), 4,88 (d a, J = 8,8 Hz, 1H), 4,53 (m, 1H), 3,98-3,91 (m, 2H), 3,82 (m, 1H), 1,65-1,20 [m 16H, incluyendo un singlete a 1,37 (9H)], 0,86 (t, J = 7,3 Hz, 3H).



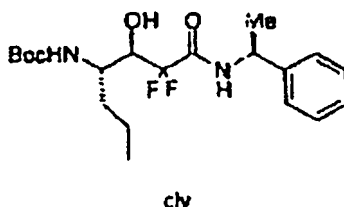
¹H RMN del compuesto cliiv (400 MHz, CDCl₃): δ 7,60-7,0 (m, 10H), 5,30-5,00 (m, 2H), 5,00-4,75 (m, 2H), 4,15-3,70 (m, 3H), 3,30-3,00 (m, 2H), 1,75-1,20 [m, 13H, incluyendo un singlete a 1,36 (9H)], 0,86 (s a, 3H).



ES 2 325 481 T3

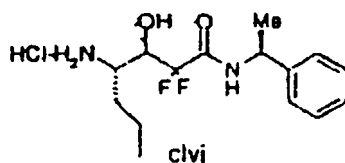
Ejemplo Intermedio 150 - compuesto clv

A una solución en DCM (10 ml) y THF (5 ml) del compuesto cli en bruto (1 g, 3,13 mmol) se le añaden HOBt (634 mg, 4,69 mmol), EDCI (781 mg, 4,07 mmol) y después (s)- α -metilbencilamina (0,604 ml, 4,69 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se seca con Na₂SO₄. La fase orgánica se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/hexanos), produciendo el compuesto clv (459 mg, 37%), ¹H RMN del compuesto clv (400 MHz, CDCl₃): δ 7,32-7,21 (m, 6H), 5,00 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,94 (m, 2H) 3,70 (m, 1H) 1,65-1,15 [m, 16H, incluyendo un doblete a 1,51 (J = 6,8 Hz, 3H), singlete a 1,39 (9H)], 0,82 (m, 3H).

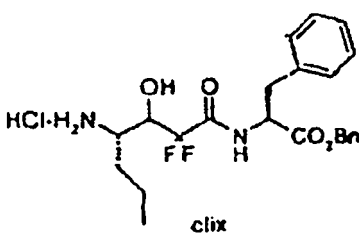
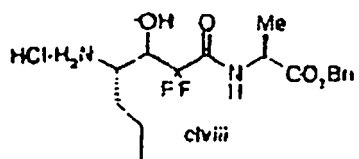
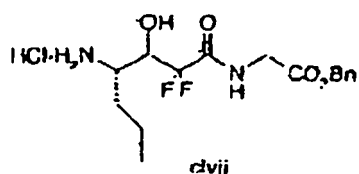


Ejemplo Intermedio 151 - compuesto clvi

El compuesto clv (220 mg, 0,55 mmol) se disuelve en HCl 4 N en dioxano (10 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y después se concentra al vacío, dando el compuesto clvi en bruto (~100%) en forma de su sal HCl.



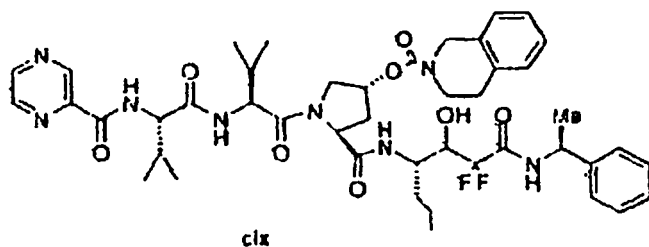
Siguiendo el procedimiento descrito para preparar el compuesto clvi, se preparan los compuestos clvii, clviii y clix con un rendimiento casi cuantitativo a partir del compuesto cli en bruto.



ES 2 325 481 T3

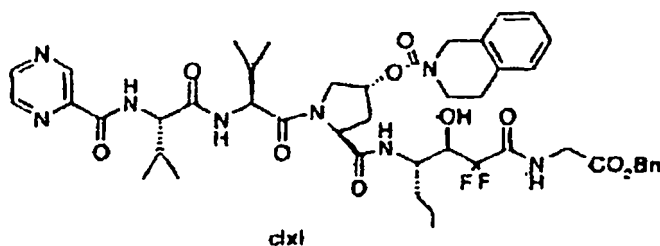
Ejemplo Intermedio 152 - compuesto *clx*

Una solución en DCM (4 ml) de la sal HCl del compuesto vii (96 mg, 0,144 mmol) se trata con PyBOP (120 mg, 0,23 mmol) y DIPEA (0,1 ml, 0,576 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución se trata con una solución en THF (4 ml) que contiene el compuesto clv (0,288 mmol) y DIPEA (0,2 ml, 1,152 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y después la fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos), produciendo el compuesto *clx* (113 mg, 89%).



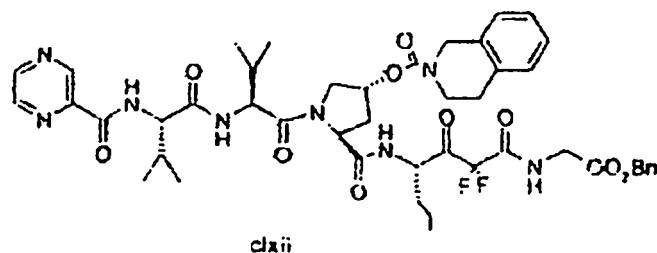
Ejemplo Intermedio 153 - compuesto *clxi*

Una solución en DCM (6 ml) del compuesto vii (140 mg, 0,235 mmol) se trata con PyBOP (196 mg, 0,376 mmol) durante 30 minutos. Después, a la solución anterior se le añade una solución en THF (6 ml) del compuesto clvii (~0,47 mmol) y DIPEA (0,327 ml, 1,88 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y se interrumpe con agua (30 minutos). La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (50 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. Las capas acuosas combinadas se extraen de nuevo con EtOAc (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (80-100 EtOAc/hexanos), produciendo el compuesto *clxi* (104 mg, 48%).



Ejemplo Intermedio 154 - compuesto *clxii*

A una solución en DCM (10 ml) del compuesto clxi (280 mg, 0,304 mmol) se le añade reactivo de DMP (193 mg, 0,456 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10%. La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80-100%/hexanos), produciendo el compuesto *clxii* (271 mg, 97%).

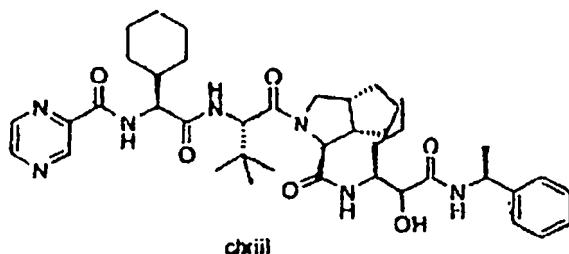


Ejemplo Intermedio 155 - compuesto *clxiii*

El compuesto lxxxiii (220 mg, 0,43 mmol) se recoge en DCM (5 ml). A la solución en DCM se le añade PyBOP (270 mg, 0,51 mmol) y se agita durante 5 minutos. A esta solución se le añade gota a gota el compuesto xxxvi (0,51

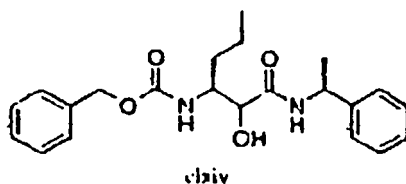
ES 2 325 481 T3

mmol) en THF (5,1 ml). A la mezcla de reacción se le añade DIPEA (0,09 ml, 0,51 mmol) y se agita durante una noche en atmósfera de N₂. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado y se lava con salmuera. La purificación con un gradiente de EtOAc del 70% al 90%/Hexano produce el compuesto clxiii (180 mg, 56%).



Ejemplo Intermedio 156 - compuesto clxiv

El compuesto cxxv (2,09 g, 7,4 mmol) se recoge en DCM (20 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (4,64 g, 8,9 mmol) y HOBt (1,2 g, 8,9 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se disminuye hasta 0°C, momento en el que se añaden S(-)- α -metilbencilamina (1,15 ml, 8,9 mmol) y DIPEA (1,55 ml, 8,9 mmol). La reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ sat. y salmuera. La purificación con EtOAc al 30%/Hexanos produce el compuesto clxiv (1,6 g, 56,3%).

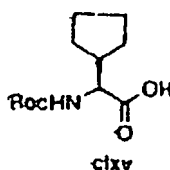


Ejemplo Intermedio 157 - compuesto xxxvi'

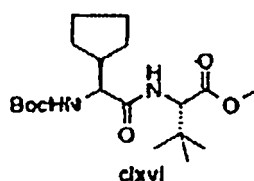
El compuesto clxiv (1,48 g, 3,8 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (300 mg) en MeOH (50 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y se concentra, dando el compuesto xxxvi' (895 mg, 94,2%).

Ejemplo Intermedio 158 - compuesto clxvi

A una solución en DCM (15 ml) del compuesto clxv (2 g, 8,2 mmol) se le añaden HOAt (1,34 g,



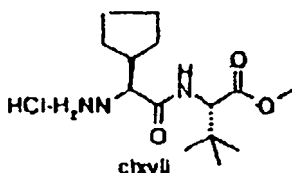
9,84 mmol) y DCC (9,84 ml, 1 M, 9,84 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en THF (9,84 ml) que contiene clorhidrato de éster metílico de *tert*-L-Leucina (9,84 mmol) y DIPEA (1,72 ml, 9,84 mmol). Después, se añade DMAP (1 g, 8,2 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después del tratamiento acuoso convencional y la cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/Hexanos), se obtiene el compuesto clxvi (1,75 g, 58%).



ES 2 325 481 T3

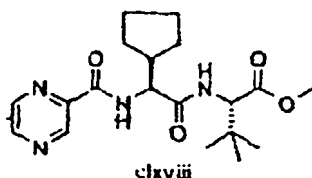
Ejemplo Intermedio 159 - compuesto clxvii

A una solución en THF (35 ml) del compuesto clxvi (1,75 g, 4,73 mmol) se le añade una solución 4 N de HCl en dioxano (11,8 ml, 47,3 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. En este momento, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo clxvii en bruto (~100%), que se disuelve de nuevo en DMF y se usa directamente en la siguiente reacción.



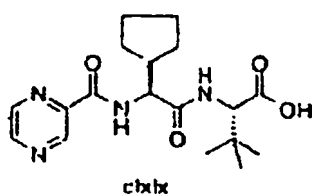
Ejemplo Intermedio 160 - compuesto clxviii

A una solución en DCM (15 ml) que contiene ácido 2-pirazinacarboxílico (447 mg, 3,6 mmol) y PyBOP (1,87 g, 3,6 mmol) se le añade una solución en DMF (15 ml) del compuesto clxvii (811 mg, 3 mmol). Después, a la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmol). La reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío, proporcionando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos), produciendo el compuesto clxviii (0,93 g, 82%).



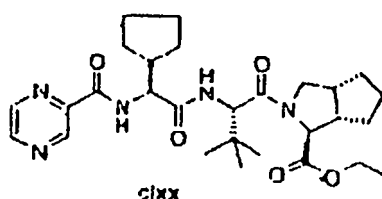
Ejemplo Intermedio 161 - compuesto clxix

A una solución en MeOH (10 ml) del compuesto clxviii (0,93 g, 2,47 mmol) se le añade NaOH 2 N (3,71 ml, 7,41 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se acidifica a pH 3 usando HCl 1 N. La reacción se diluye con EtOAc (75 ml) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío, dando el compuesto clxix (~100%).



Ejemplo Intermedio 162 - compuesto clxx

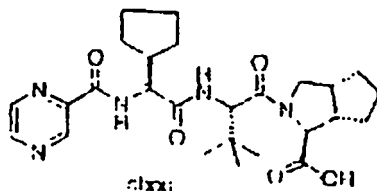
Una solución en DCM (10 ml) del compuesto clxix (2,47 mmol) se trata con HOAt (436 mg, 3,21 mmol) y DCC (3,2 ml, 1 M, 3,2 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (13,6 ml) del compuesto v (499 mg, 2,72 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, los sólidos de color blanco (urea) se filtran. Los filtrados se concentran al vacío, dando un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, produciendo el compuesto clxx (0,99 g, 76%).



ES 2 325 481 T3

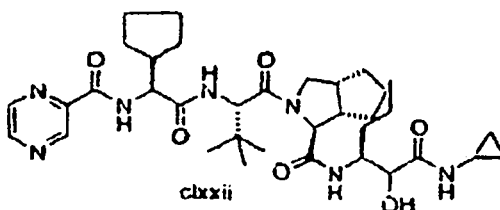
Ejemplo Intermedio 163 - compuesto clxxi

Una solución en EtOH (20 ml) del compuesto clxx (0,99 g, 1,88 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,81 ml, 5,63 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con HCl 1 N. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml). La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, dando el compuesto clxxi (772 mg, 82%).



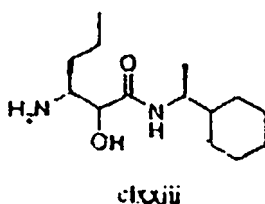
Ejemplo Intermedio 164 - compuesto clxxii

Una solución en DCM (10 ml) del compuesto clxxi (290 mg, 0,58 mmol) se trata con PyBOP (484 mg, 0,93 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (7,5 ml) del compuesto xiii' (140 mg, 0,75 mmol), seguido de DIPEA (0,13 ml, 0,75 mmol). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), produciendo el compuesto clxxii 290 mg (75%).

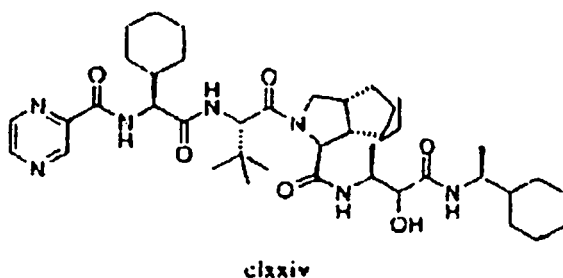


Ejemplo Intermedio 165 - compuesto clxxiii

El compuesto lxxxiii (600 mg, 1,17 mmol) se recoge en DCM (4 ml). Se añade PyBOP (670 mg, 1,3 mmol), se agita durante cinco minutos y se enfría a 0°C. A esta solución se le añade gota a gota el compuesto clxxiii (333 mg, 1,3 mmol)



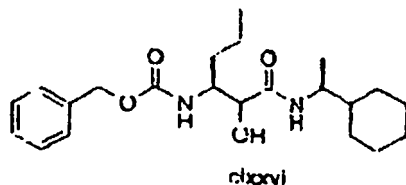
en THF (1,3 ml). A la mezcla de reacción se le añade DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol) y se deja calentar a temperatura ambiente con agitación durante dos noches. Al día siguiente, la reacción se concentra y se purifica con EtOH al 2%/EtOAc, dando el compuesto clxxiv en bruto (900 mg, exceso del 100%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 166 - compuesto clxxxv

El compuesto cxxv (3,01 g, 10,7 mmol) se recoge en DCM (30 ml) y la temperatura se disminuye hasta $\sim 78^{\circ}\text{C}$. A esta solución se le añaden PyBOP (6,1 g, 11,7 mmol) y HOBt (1,58 g, 11,7 mmol) seguido de (S)-(+)-1-ciclohexil-etilamina, compuesto clxxv, (1,74 ml, 11,7 mmol) y DIPEA (2,1 ml, 11,7 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con HCl 0,1 N, NaHCO_3 saturado y salmuera. El producto se purifica en EtOAc al 40%/Hex, dando 2 g (47,8%) del compuesto clxxvi.

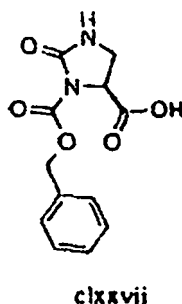


20 Ejemplo Intermedio 167 - compuesto clxxiii

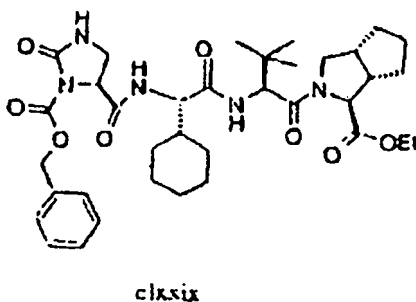
El compuesto clxxvi (2 g, 5,13 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de H_2 . La mezcla de reacción se filtra a través de celite y se concentra, dando el compuesto clxxiii (1,31 g, 99,8%).

25 Ejemplo Intermedio 168 - compuesto clxxix

En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve en compuesto clxxvii [1-bencil éster del ácido (S)-(-)-2-oxo-1,5-imidazolina dicarboxílico]



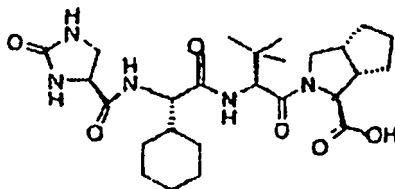
(290 mg, 1,1 mmol) en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (151 mg, 1,2 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmol) seguido de la adición del compuesto clxxviii (1 mmol, 435 mg.) en DMF anhidra (4 ml). Se deja que la reacción alcance lentamente la temperatura ambiente y se agita durante 2 días. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava 2 veces con HCl 1 N (50 ml) y 1 vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO_4 . El disolvente se evapora a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM y eluyendo con EtOAc al 30% y después al 50%/DCM y después con MeOH al 2%/EtOAc), produciendo el producto clxxix (434 mg, 64%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 169 - compuesto clxxx

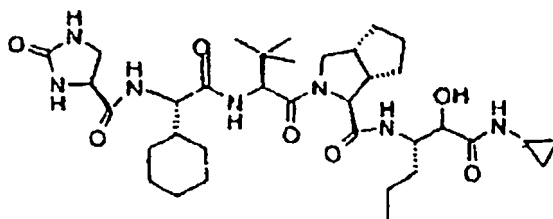
El material de partida clxxix (434 mg, 0,64 mmol) se disuelve en dioxano (6 ml) y una solución acuosa 0,5 M de NaOH (4 ml, 3 equiv.). La reacción se deja proceder durante una noche. El análisis por TLC en EtOAc al 100% (usando tinción con PMA) muestra además del producto ácido esperado del principio, un producto de realización más rápida. La mezcla de reacción se acidifica a pH 2 con HCl 1 N y después se extrae 2 veces con EtOAc. A la solución acuosa se le añade NaCl sólido para facilitar la extracción. Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO₄ y se evaporan a presión reducida. El análisis por EM indica que el grupo CBZ se retira por hidrólisis. El compuesto resultante clxxx (rendimiento cuantitativo) se usa tal cual en la siguiente etapa.



clxxx

Ejemplo Intermedio 170 - compuesto clxxxi

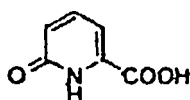
En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, el compuesto clxxx (279 mg, 0,54 mmol) se disuelve en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (82 mg, 0,65 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,11 ml, 0,65 mmol), seguido de la adición del compuesto xiii' (0,7 mmol) en DMF anhidra (4 ml). Se deja que la reacción alcance lentamente la temperatura ambiente y se agita durante 21 horas. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava 2 veces con HCl 1 N (50 ml) y 1 vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se limpia por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM y eluyendo con EtOAc al 50%/Hexano, después MeOH al 3%/EtOAc, después EtOH al 20%/EtOAc). Después de la retirada del disolvente, el residuo se disuelve de nuevo en Dri Solv THF y se filtra para retirar cualquier cantidad residual de gel de sílice. Después, la retirada del disolvente produce el compuesto clxxxi (434 mg, 64% de rendimiento).



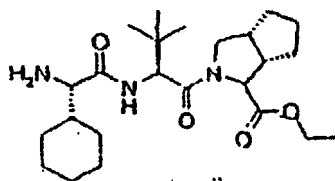
clxxxi

Ejemplo Intermedio 171 - compuesto clxxxiii

En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve 6-hidroxi picolínico



(153 mg, 1,1 mmol) en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (151 mg, 1,2 mmol) y después la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmol) seguido de la adición del compuesto clxxxii (1,0 mmol, 435 mg.) en DMF anhidra (4 ml).

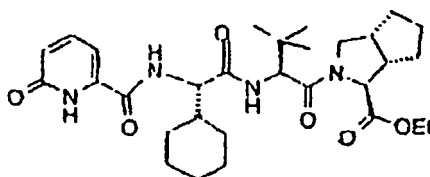


clxxxii

Se deja que la reacción alcance lentamente la temperatura ambiente y se agita durante 2 días. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava 2 veces con HCl 1 N (50 ml) y 1

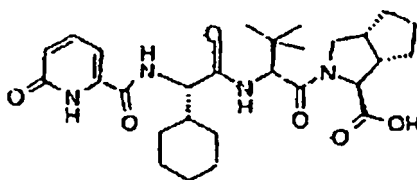
ES 2 325 481 T3

vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO_4 . El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM, eluyendo con EtOAc al 30 y después al 50%/DCM, y después con MeOH al 2%/EtOAc), produciendo el compuesto clxxxiii recogido (314 mg, 56%).



Ejemplo Intermedio 172 - compuesto clxxxiv

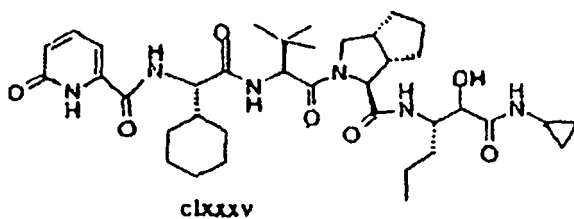
El material de partida clxxxiii (314 mg, 0,56 mmol) se disuelve en dioxano (5 ml) y NaOH 0,5 M (3,4 ml, 3 equiv.). La reacción se realiza durante una noche. El análisis por TLC en EtOAc al 100% (usando UV) muestra la conversión completa en el producto ácido de realización lenta en el origen. La reacción se acidifica a pH 2 con HCl 1 N y después se extrae 2 veces con EtOAc. Se añade NaCl sólido para facilitar la extracción. Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO_4 y después se evaporan a presión reducida, produciendo el compuesto clxxxiv (0,5 mmol, 89%) que se usa tal cual en la siguiente etapa.



clxxxiv

Ejemplo Intermedio 173 - compuesto clxxxv

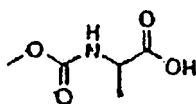
En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, el compuesto ácido clxxxiv (265 mg, 0,5 mmol) se disuelve en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAT (75,6 mg, 0,6 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,1 ml, 0,6 mmol) seguido de la adición del compuesto xiii (0,65 mmol) en DMF anhidra (4 ml). Se deja que la reacción alcance lentamente la temperatura ambiente y se agita durante 21 horas. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene EtOAc (120 ml) y se lava 2 veces con HCl 1 N (50 ml) y 1 vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO_4 . El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM, eluyendo con EtOAc al 50%/Hexano, después con EtOAc puro y después con MeOH al 4%/EtOAc), produciendo el producto compuesto clxxxv (185 mg, 52%).



clxxxv

Ejemplo Intermedio 174 - compuesto cxxxiv'

A una solución de D-alanina (5 g, 56,1 mmol) en NaOH 1 N (152 ml, 152 mmol) a 0°C se le añade una solución de MeOC(O)Cl (6,5 ml, 84,2 mmol) en éter dietílico (30 ml). La mezcla se agita en un baño de hielo durante 3 horas y después se ajusta a pH 9 con NaOH 1 N. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla se lava con éter (3 x 50 ml), se acidifica a pH ~2 con HCl 5 N y se extrae con EtOAc (5 x 50 ml). El extracto orgánico se lava con agua y salmuera y después se seca (MgSO_4). El disolvente se retira, produciendo el compuesto cxxxiv, N-metoxycarbonil-D-alanina, en forma de un aceite incoloro (6,48 g, 79%).

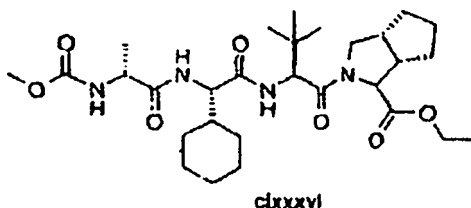


cxxxiv

ES 2 325 481 T3

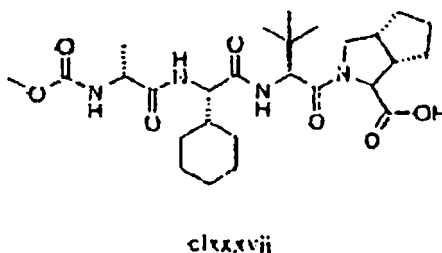
Ejemplo Intermedio 175 - compuesto clxxxvi

Una solución de N-metilcarbonil-D-alanina (0,193 g, 1,31 mmol) y HOAt (0,177 g, 1,31 mmol) en DCM (10 ml) enfriada en un baño de hielo se trata con DCC (1,31 ml, 1,31 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 0,5 horas, se añade una solución del compuesto clxxxii preparado (0,88 mmol) en THF (8,8 ml). La mezcla se calienta a temperatura ambiente y se agita durante una noche, después se enfría en un baño de hielo y se interrumpe con una solución saturada de NaHCO₃. Los precipitados se filtran y el filtrado se recoge en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera y después se seca (MgSO₄). Después de la retirada del disolvente, el residuo se purifica por cromatografía en columna de sílice (EtOAc al 60%/Hexano), produciendo el compuesto clxxxvi en forma de una espuma gomosa (0,321 g, 68%).



Ejemplo Intermedio 176 - compuesto clxxxvii

A una solución del compuesto clxxxvi (0,321 g, 0,597 mmol) en EtOH (5 ml) a 5°C se le añade NaOH 2 N (1,05 ml, 2,1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se acidifica a pH ~2 con HCl 1 N y el EtOH se retira por evaporación rotatoria. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y el extracto combinado se lava con salmuera y después se seca MgSO₄. El disolvente se retira y el residuo se seca al vacío, dando el compuesto clxxxvii en forma de una espuma gomosa (0,235 g, 77%).

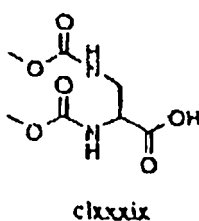


Ejemplo Intermedio 177 - compuesto clxxxviii

Una solución del compuesto clxxxvii (0,363 g, 0,712 mmol) en DCM (10 ml) se enfría en un baño de hielo y se trata con PyBOP (0,594 g 1,14 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 horas, la mezcla se enfría en un baño de hielo y se trata con una solución del compuesto xiii' (1,1 mmol) en THF (11 ml) y DIPEA (0,249 ml, 1,42 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche y se interrumpe con una solución de NH₄Cl. El disolvente se concentra y la mezcla se recoge en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera y después se seca (MgSO₄). Después de la retirada del disolvente, el residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 5%/EtOAc), dando clxxxviii (0,341 g, 71%).

Ejemplo Intermedio 178 - compuesto clxxxix

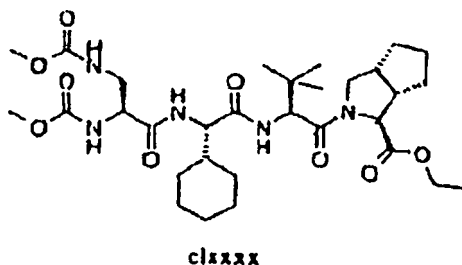
Se recoge ácido diaminopropiónico (3 g, 28,7 mmol) en NaOH 1 M (86,2 ml, 86,2 mmol), se enfría a 0°C y después se añade MeOC(O)Cl (5,54 ml, 71,75 mmol) en Et₂O (25 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. El pH de la mezcla de reacción se disminuye hasta 2 y la fase acuosa se extrae 3 veces con EtOAc. Los extractos se combinan y se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, produciendo el compuesto clxxxix (3,09 g, 48,9%).



ES 2 325 481 T3

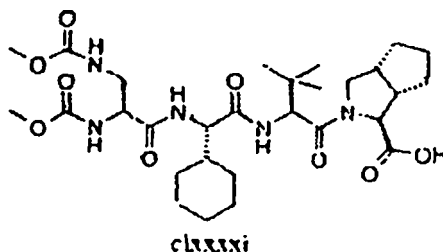
Ejemplo Intermedio 179 - compuesto *clxxxx*

El compuesto *clxxxix* (340 mg, 1,55 mmol) se recoge en DCM (4 ml). Se añaden DCC (1,7 mmol) y HOAt (235 mg 1,7 mmol) seguido del compuesto *clxxxii* (1,7 mmol) en DCM (3,4 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una capa de sílice y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 75%/Hex, dando el compuesto *clxxxx* (715 mg, 72,4%).



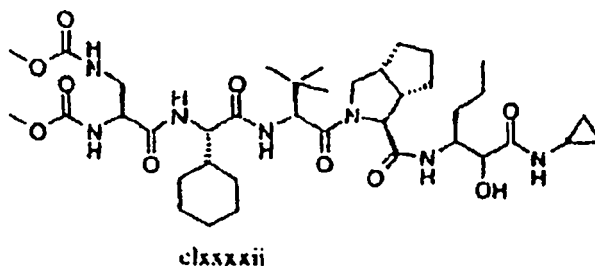
Ejemplo Intermedio 180 - compuesto *clxxxix*

El compuesto *clxxxx* (715 mg, 1,12 mmol) se hidroliza en condiciones convencionales, usando EtOH (4 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto *clxxxix* (600 mg, 88,0%).



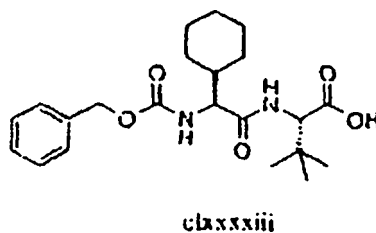
Ejemplo Intermedio 181 - compuesto *clxxxii*

El compuesto *clxxxxi* (550 mg, 0,9 mmol) se recoge en DCM (8 ml). Se añade PyBOP (675 mg, 1,3 mmol) seguido del compuesto *xiii'* (1,3 mmol) en THF (1,3 ml). Se añade DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol) y la solución resultante se agita durante una noche. Al día siguiente, la reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y después con salmuera, antes de concentrarse, produciendo un residuo. El residuo resultante se purifica con EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto *clxxxii* (290 mg, 41,5%).



Ejemplo Intermedio 182 - compuesto *clxxxiii*

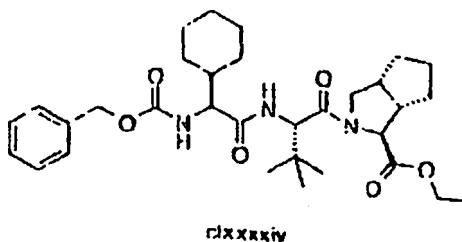
Se hidroliza éster metílico de Cbz-ciclohexiglicina-*terc*-leucina (7,36 g, 17,6 mmol) en condiciones convencionales usando MeOH (60 ml) y NaOH 1 N (52,8 ml, 3 equiv.), produciendo intermedio *clxxxiii* (92%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 183 - compuesto clxxxiv

El compuesto clxxxiii (3,82 g, 9,46 mmol) se recoge en DCM (30 ml). Se añade DCC (11,35 mmol) en DCM (11,35 ml), seguido de la adición de HOAt (1,54 g, 11,35 mmol). La mezcla resultante se agita cinco minutos y se añade el compuesto v (9,46 mmol) en THF (40 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y después con salmuera, antes de concentrarse, produciendo un residuo. El residuo resultante se purifica con un gradiente del 20% al 30% sobre gel de sílice, dando el compuesto clxxxiv (3,03 g, 56,3%).

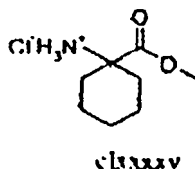


Ejemplo Intermedio 183 - compuesto clxxxii

El compuesto clxxxiv (3,03 g, 5,33 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (30 ml) en atmósfera de H₂ durante 4 horas, produciendo el compuesto clxxxii (2,3 g, 99%).

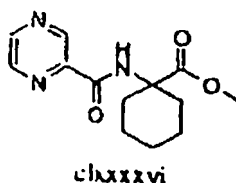
Ejemplo Intermedio 184 - compuesto clxxxv

A una solución de ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico (2,86 g, 20 mmol) en MeOH (40 ml) se le añade gota a gota SOCl₂ (3 ml) a 0°C. La mezcla se calienta lentamente a temperatura ambiente y después se calienta a reflujo durante 5 horas. Después, a la solución transparente se le añade Et₂O y el precipitado se aísla. El sólido se seca adicionalmente al vacío, produciendo el compuesto clxxxv (95%) en forma de un polvo de color blanco.



Ejemplo Intermedio 185 - compuesto clxxxvi

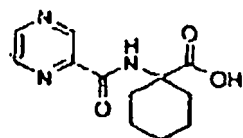
Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (1 g, 8 mmol, 1 equiv.) en DCM (15 ml) con la adición de HOAt (1,1 g, 8 mmol) y DCC (8 ml, 1 M) en DCM. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la mezcla activada se le añade el compuesto clxxxv (1,3 g, 8 mmol). Posteriormente, se añade DHPEA (2 ml, 12 mmol), seguido de DMAP (1,5 g, 12 mmol). Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de celite, se concentra y el producto deseado clxxxvi se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano) en forma de un aceite de color amarillo (2,1 g, 100%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 186 - compuesto clxxxvii

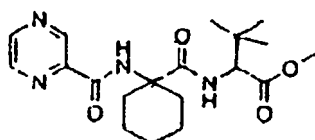
El compuesto clxxxvi (1,06 g, 2,6 mmol) se disuelve en MeOH (30 ml) con la adición de NaOH 2 N (ac.) (12 ml, 24 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche antes de que el análisis por TLC (EtOAc al 50%/hexano) indique que la hidrólisis se ha completado. Después, la solución se acidifica a pH 3 con HCl 5 N y se diluye con EtOAc y seguido de extracción de la fase orgánica. Posteriormente, la fase orgánica se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto clxxxvii (84%) después de la concentración.



clxxxvii

Ejemplo Intermedio 187 - compuesto clxxxviii

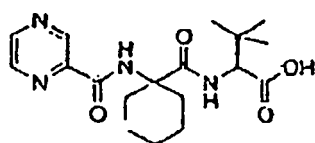
El compuesto clxxxvii (1,6 g, 6,4 mmol) se disuelve en DCM (18 ml) y después se añaden HOAt (0,96 g, 7 mmol) y DCC (7 ml, 1 M en DCM) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la mezcla activada se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-leucina (7 ml, 1 M en THF). Posteriormente, se añade DIPEA (1,2 ml, 7 mmol), seguido de DMAP (1,2 g, 9,8 mmol). Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de celite, se purifica por cromatografía en columna y se concentra, produciendo el compuesto clxxxviii (EtOAc al 60%/hexano) en forma de un sólido de color blanco (1,74 g, 72%).



clxxxviii

Ejemplo Intermedio 188 - compuesto cic

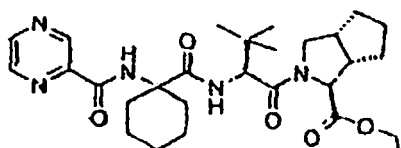
El compuesto clxxxviii (1,74 g, 4,6 mmol) se disuelve en MeOH (22 ml) con adición de NaOH 2 N (ac.) (7 ml, 14 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche antes de que el análisis por TLC (EtOAc al 30%/hexano) indique que la hidrólisis se ha completado. La solución se acidifica a pH 3 con HCl 5 N y se diluye con EtOAc y después se extrae la fase orgánica. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y después se concentra, produciendo el compuesto cic (100%).



cic

Ejemplo Intermedio 189 - compuesto cc

A una solución en DCM (15 ml) del compuesto cic (1,5 g, 4,1 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (10 mg, 4,5 mmol), seguido de una solución 1 M de DCC en DCM (4,5 ml, 4,5 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se añade una solución en THF (20 ml, 0,2 M) del compuesto v (4 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se filtra a través de celite. El filtrado se concentra para dar un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/hexano), produciendo el compuesto cci (660 mg, 32%).

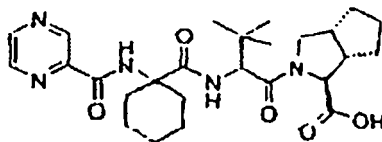


cc

ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 190 - compuesto cci

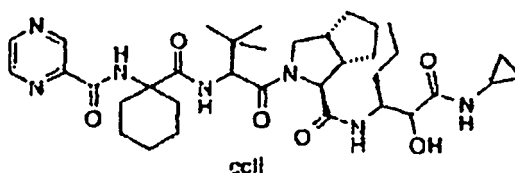
A una solución en EtOH (6 ml) del compuesto cc (600 mg, 1,13 mmol) se le añade NaOH 2 N (1,7 ml, 3,4 mmol). La reacción se agita durante 2 horas a temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 con HCl 5 N. Después, la mezcla se diluye con EtOAc, seguido de la extracción de la fase orgánica. Posteriormente, la fase orgánica se lava con salmuera y después se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cci (92%) después de la concentración.



cci

Ejemplo Intermedio 191 - compuesto ccii

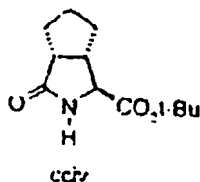
A una solución en DCM (8 ml) de ccii (310 mg, 0,62 mmol) se le añade PyBOP (420 mg, 0,8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (8 ml, 0,1 M) en THF, seguido de la adición de DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y después se seca sobre MgSO₄ antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3%/EtOAc) produce el compuesto ccii (140 mg, 33%).



ccii

Ejemplo Intermedio 192 - compuesto ccxiv

A una solución del compuesto cciii, (*N*-difenilmetileno)-glicina éster de *tert*-butilo, (6 g, 0,0206 mmol) y PTC quiral (1,08 g, 0,00206 mmol) en DCM seco (48 ml), en atmósfera de N₂, a -60°C, se le añade CsOH·F₂O (6,9 g, 0,0412 mmol). A la mezcla de reacción se le añade gota a gota éster metílico de 1-carboxi-1-ciclopenteno (5,2 ml, 0,0412 mmol) en 10 ml de DCM. La mezcla se agita durante 4 días a -60°C y después se diluye con 200 ml de Et₂O y se añaden 15 ml de una solución acuosa saturada de NH₄Cl. Las fases se separan y la fase orgánica se lava con 15 ml de agua y 15 ml de salmuera. Las fases acuosas se extraen con 100 ml de Et₂O. Las fases orgánicas se unen y se secan sobre Na₂SO₄. El producto en bruto se obtiene por retirada del disolvente, se disuelve en 100 ml de EtOH y después se añaden NH₂OH·HCl (1,43 g, 0,0206 mmol) y NaOAc (1,68 g, 0,0206 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Después, el disolvente se retira y el residuo en bruto obtenido se purifica directamente por cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc al 30%-50%/hexano, produciendo el compuesto ccxiv (65%) en forma de un sólido de color blanco. C₁₂H₁₉NO₃ (PM = 225,29); EM: m/z (M⁺ 1) = 226,5. Exceso Enantiomérico: 18% de ee, determinado por HPLC quiral.



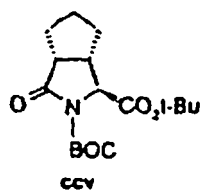
ccxiv

Ejemplo Intermedio 193 - compuesto ccv

A una solución del compuesto cciv (2 g, 0,0088 mmol) en 60 ml de ACN se le añaden una cantidad catalítica de DMAP (0,216 g, 0,0017 mmol) y una solución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (2,49 g, 0,011 mmol) en 30 ml de ACN. La mezcla se agita durante 14 horas a temperatura ambiente, después se diluye con 100 ml de DCM y se lava con NaHCO₃ saturado (10 ml) y con salmuera (10 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. La evaporación del

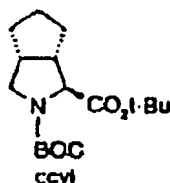
ES 2 325 481 T3

disolvente produce un producto en bruto que se purifica sobre una columna de gel de sílice eluyendo con EtOAc al 15%/hexano, dando el compuesto ccv (86%) en forma de un sólido de color blanco. $C_{17}H_{27}NO_5$ PM = 325,40 EM: $m/z (M^+ + 1) = 326,2$



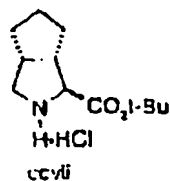
Ejemplo Intermedio 194 - compuesto ccvi

A una solución del compuesto ccv (1,7 g, 0,0032 mmol) en 50 ml de THF (0,14 M) a $-78^{\circ}C$ se le añade DIBAL-H (7,8 ml, 0,0078 mmol). La mezcla se agita durante 1 hora y después se añaden 10 ml de MeOH. La mezcla se diluye con 25 ml de EtOAc y 25 ml de una solución acuosa saturada de tartrato sódico, y después se agita a temperatura ambiente durante una hora. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae una vez con 50 ml de EtOAc. La fase orgánicas se combinan y se secan sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente da un residuo en bruto que se usa sin purificación. El producto en bruto se disuelve en 25 ml de DCM, se añade Et_3Si (0,84 ml, 0,0052 mmol) y después la mezcla se enfría a $-78^{\circ}C$ antes de la adición gota a gota de BF_3OEt_2 (0,71 ml, 0,0061 mmol). Después de 30 minutos, se añaden Et_3Si (0,84 ml) y BF_3OEt_2 (0,71 ml) y la mezcla se agita durante 2 horas a $-78^{\circ}C$. Después, la reacción se interrumpe con $NaHCO_3$ acuoso saturado (10 ml) y se extrae con DCM (2 x 20 ml). La fase orgánicas se combinan y se secan sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente da un residuo en bruto que se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc al 13%/hexano, produciendo el compuesto ccvi (87%). $C_{17}H_{29}NO_4$ PM = 311,42 EM: $m/z (M^+ + 1) = 312,6$



Ejemplo Intermedio 195 - compuesto ccvii

El compuesto ccvi (0,5 g, 0,0016 mmol) se disuelve en 8 ml de HCl 1 N en EtOAc (preparado burbujeando HCl seco en EtOAc seco y después diluyéndolo a 1 N con más cantidad de EtOAc). La mezcla se agita durante 6 horas a temperatura ambiente. El disolvente se retira al vacío y el precipitado resultante se disuelve en Et_2O . Después de agitar la mezcla durante 15 minutos, el disolvente se retira a presión reducida. El sólido de color blanco resultante se lava con Et_2O y el compuesto ccvii (0,27 g, 80% de rendimiento) se aísla por filtración. $C_{12}H_{21}NO_2$ PM 211,15 EM: $m/z (M^+ + 1) = 212,6$



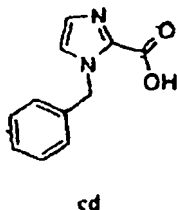
Ejemplo Intermedio 196 - compuesto v

A una solución del compuesto ccvii (0,230 g, 0,74 mmol) en DCM (3,7 ml) se le añade TFA (2,85 ml). La mezcla se agita durante una noche, después el disolvente se retira al vacío a sequedad y el residuo se disuelve en EtOH (7,5 ml). La mezcla se enfría a $0^{\circ}C$, se añade gota a gota $SOCl_2$ (0,22 ml, 2,96 mmol) y después se calienta a reflujo durante 2 horas. El EtOH se retira a presión reducida y el residuo se disuelve en DCM (10 ml). La solución resultante se lava dos veces con una solución saturada acuosa de $NaHCO_3$ (5 ml). Las fases se separan, la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se retira al vacío, produciendo el compuesto μ (80%) en forma de un aceite. $C_{10}H_{17}NO_2$ PM: 183,25 MS: $m/z (M^+ + 1) = 184,2$.

ES 2 325 481 T3

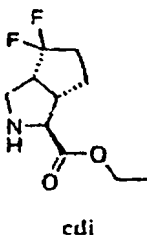
Ejemplo Intermedio 197 - compuesto cd

Se recoge 1-bencilimidazol (6 g, 37,9 mmol) en Et₂O (180 ml). La temperatura de la solución resultante se disminuye hasta -60°C y se trata con *n*-BuLi (1,6 M, 24 ml). La reacción se agita durante 30 minutos y después se burbujea CO₂ a través de la mezcla durante 15 minutos. El precipitado se filtra, se aclara con Et₂O y después se recoge en H₂O. Esta solución acuosa se acidifica a pH 3 con HCl 5 N. El producto deseado, cd, se aísla después de la liofilización en forma de un sólido de color blanco.



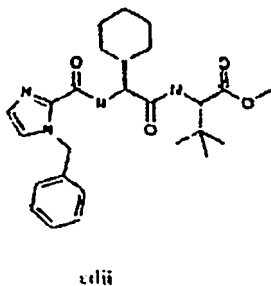
Ejemplo Intermedio 198 - compuesto cdi

Una solución en DCM (100 ml) del compuesto i (9,25 g, 27,9 mmol) se trata a 0°C con DAST (9,2 ml, 69,8 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la reacción se interrumpe con hielo y se extrae con DCM (200 ml). La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío. El residuo se purifica con cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 30%/hexanos), produciendo 8,5 g (86%) del intermedio fluorado deseado. Una porción de este intermedio (4,5 g, 14,2 mmol) se disuelve en EtOH (75 ml). Esta solución se somete a condiciones de hidrogenación convencionales usando Pd (OH)₂/C (2,98 g, contenido de Pd al 20%, 4,26 mmol). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se concentran al vacío, produciendo el compuesto cdi (2,5 g, 96%).



Ejemplo Intermedio 199 - compuesto cdii

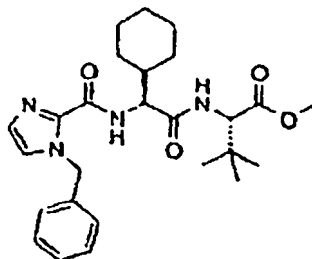
A una solución del compuesto cd (890 mg, 4,4 mmol) recogido en DCM (15 ml) se le añaden HOBt (595 mg, 4,4 mmol) y DCC (4,4 mmol, 1 M en DCM) y se agita durante 20 minutos. A esta mezcla se le añade una solución en DCM (15 ml) de lxxix' (990 mg, 3,5 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío, dando un residuo, que se purifica en EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto cdii (666 mg, 41%).



ES 2 325 481 T3

Ejemplo Intermedio 200 - compuesto *cdviii*

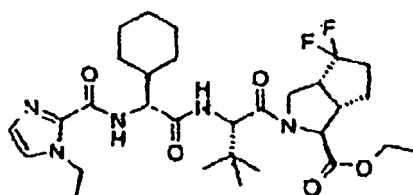
El compuesto *cdiii* se prepara a partir del compuesto *cdii* en condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol metílico (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.). Se recuperan 565 mg del compuesto *cdiii* (88%).



cdiii

Ejemplo Intermedio 201 - compuesto *cdiv*

El compuesto *cdiii* (124 mmol) se recoge en DCM (5 ml). Se añade DCC (1,6 mmol, DCM 1 M) seguido de HOAT (1,6 mmol). La mezcla resultante se agita 20 minutos y

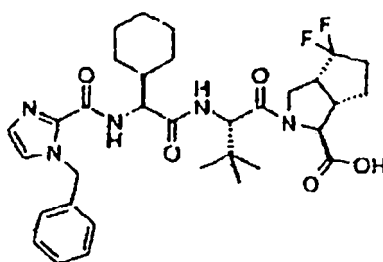


cdiv

se añade gota a gota el compuesto *cdi* (1,6 mmol) en THF (8 ml). La reacción se agita durante una noche. La reacción se filtra y se aclara con EtOAc. La fase orgánica combinada se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra. La purificación se realiza en EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto *cdiv* (565 mg, 70%).

Ejemplo Intermedio 202 - *cdv*

El compuesto *cdv* (565 mg, 0,86 mmol) se prepara a partir del compuesto *cdiv* en condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol etílico (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.). Se recuperan 490 mg (91%) del compuesto *cdv*.

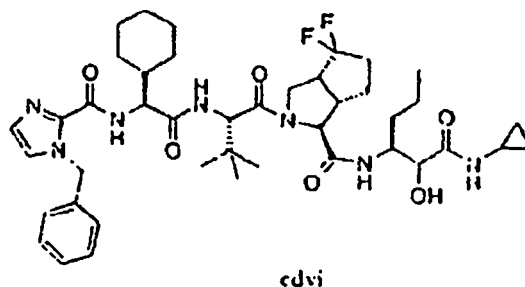


cdv

ES 2 325 481 T3

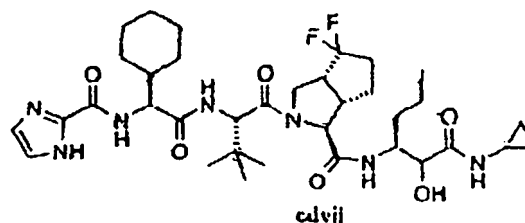
Ejemplo Intermedio 203 - *cdvi*

El compuesto *cdv* (490 mg, 0,78 mmol) se recoge en DCM (10 ml). A la solución en DCM se le añade PyBOP (520 mg, 1 mmol) seguido de una solución en THF (10 ml) de *xiii* (186 mg, 1 mmol). A la mezcla de reacción se le añade DIEA (0,18 ml, 1 mmol) y se agita durante una noche en atmósfera de nitrógeno. Al día siguiente, la reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La purificación se realiza en EtOAc al 100%, produciendo el compuesto *cdvi* (478 mg, 77%).



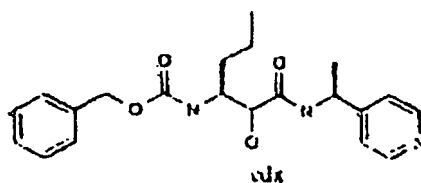
Ejemplo Intermedio 204 - *cdvii*

El compuesto *cdvi* (478 mg, 0,6 mmol) se hidrogena usando Pd(OH₂)/C (base seca al 20%, 100 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de hidrógeno. En este momento, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra, produciendo el compuesto *cdvii* (417 mg, 98%).



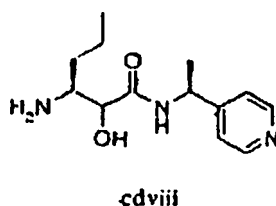
Ejemplo Intermedio 205 - *cdx*

El compuesto *cxxv* (adquirido en Albany Molecular Research Inc., 15 g, 5,2 mmol) se recoge en DCM (15 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (2,7 g, 5,2 mmol) y HOBT (700 mg, 5,2 mmol). A la solución anterior se le añade una solución en THF (15 ml) de (-)-alfa-(4-piridil)etil amina (640 mg, 5,2 mmol), seguido de DIEA (0,93 ml, 5,2 mmol). [La (-)-alfa-(4-piridil)etil amina se obtiene a partir de la sal tartrato de (-)-alfa-(4-piridil)etil amina (Aldrich) por agitación con NaOH 1 N (2 equiv.) durante 1 hora seguido de extracción con EtOAc (3 x), recuperación del 70%]. La reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. El producto se purifica en EtOH al 5%/EtOAc, produciendo 2 g (99%) del compuesto intermedio *cdx*.



Ejemplo Intermedio 206 - *cdviii*

El compuesto *cdx* (2 g, 5,2 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (50 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en atmósfera de hidrógeno. El producto se filtra a través de celite y se concentra, dando el compuesto *cdviii* (1,3 g, 98%).



Farmacología

Los compuestos de acuerdo con la invención descritos en este documento son útiles porque pueden inhibir la proteasa de VHC y, por lo tanto, también son útiles para inhibir la replicación del VHC.

Por consiguiente, una invención del presente documento se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir proteasas de VHC que comprende poner en contacto una cantidad inhibidora anti-proteasa de VHC de un compuesto BW o CU con una composición que comprende proteasa de VHC.

Otra invención del presente documento se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación de VHC, que comprende poner contacto VHC con una cantidad eficaz de un compuesto BW o CU. Además, otra invención del presente documento se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece o está expuesto a una infección por VHC, que comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de compuesto BW o CU. Debe entenderse que las referencias en este documento al tratamiento de una infección por VHC incluyen terapia profiláctica para prevenir o inhibir la infección así como el tratamiento de una infección aguda o crónica por VHC establecida o situaciones fisiológicas asociadas con la infección por VHC para curar la infección en el paciente, inhibir el grado (cantidad) de infección o mejorar las condiciones fisiológicas asociadas con dicha infección. Se entiende que "cantidad eficaz" describe una cantidad del compuesto de la presente invención eficaz dentro del alcance de un criterio biológico razonable, adecuada para uso en contacto con las células de seres humanos y otros mamíferos sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y que está proporcionada con una relación razonable de beneficios/riesgos en el tratamiento de una infección por VHC y, por lo tanto, que produce el efecto terapéutico deseado.

Las situaciones fisiológicas descritas en este documento incluyen algunas, pero no todas las situaciones clínicas posibles en las que se justifica un tratamiento anti-VHC. Los especialistas en este campo serán conscientes de las circunstancias que requieren un tratamiento anti-VHC.

Un aspecto particular de la invención proporciona un compuesto de acuerdo con la invención que deberá administrarse en forma de una composición farmacéutica, aunque el compuesto puede administrarse solo. "Composición farmacéutica" significa una composición que comprende un compuesto BW o CU y al menos un componente seleccionado entre el grupo que comprende soportes, diluyentes, recubrimientos, adyuvantes, excipientes, o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes conservantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizadores de la emulsión, agentes de suspensión, agentes isotónicos, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de perfume, agentes colorantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, otros agentes terapéuticos, agentes lubricantes, agentes para promover o retrasar la adsorción y agentes de distribución, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas farmacéuticas. Las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires o jarabes. Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno-sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias. Los ejemplos de agentes antibacterianos y antifúngicos para la prevención de la acción de microorganismos incluyen parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Los ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, cloruro sódico y similares. Los ejemplos de agentes para retrasar la adsorción para prolongar la absorción incluyen monoestearato de aluminio y gelatina. Los ejemplos de agentes promotores de la adsorción para mejorar la absorción incluyen dimetil sulfóxido y análogos relacionados. Los ejemplos de soportes, diluyentes, disolventes, vehículos, agentes solubilizantes, emulsionantes y estabilizadores de la emulsión incluyen agua, cloroformo, sacarosa, etanol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, alcohol tetrahidrofurfurílico, polioles de benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, glicerol, polietilenglicoles, dimetilformamida, Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, aceites vegetales (tales como aceite de algodón, aceite de cacahuate, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo y similares, o mezclas adecuadas de estas sustancias. Los excipientes ilustrativos incluyen lactosa, azúcar de la leche, citrato sódico, carbonato cálcico y fosfato dicálcico. Los ejemplos de agentes disgregantes incluyen almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, laurilsulfato sódico, talco, así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Pueden usarse otros agentes terapéuticos en combinación con un compuesto de la presente invención, incluyendo otros agentes anti-VHC. Algunos ejemplos de agentes anti-VHC conocidos incluyen agentes inmunomoduladores tales como interferones α , β o γ ; compuestos de interferón- α modificados pegilados, otros agentes antivirales tales como ribavirina y amantadina; otros inhibidores de proteasas de hepatitis C; inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida del VHC incluyendo la helicasa, polimerasa, metaloproteasa, la entrada de ribosomas internos o compuestos antivirales de amplio espectro tales como VX 497, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa celular, IMPDH, mencionado por la Patente de Estados Unidos N° 5.807.876; o combinaciones de los mismos. Los agentes terapéuticos usados en combinación con un compuesto de la presente invención pueden administrarse por separado de forma simultánea o secuencial.

ES 2 325 481 T3

La elección de un material en la composición farmacéutica distinto del compuesto BW o CU generalmente se determina de acuerdo con propiedades químicas del compuesto activo tales como solubilidad, el modo particular de administración y las disposiciones a cumplir en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, para preparar comprimidos pueden usarse excipientes tales como lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato dicálcico y agentes disgregantes tales como almidón, ácidos algínicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato sódico y talco.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en formas diversas tales como comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires o jarabes.

“Forma de dosificación líquida” significa que la dosis del compuesto activo a administrar al paciente está en forma líquida, por ejemplo, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Cuando se usan suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o un agente que facilite la suspensión.

La fase oleosa de la composición farmacéutica en emulsión puede constituirse a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (conocido de otra manera como emulgente), deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el o los emulsionantes con o sin el o los estabilizantes constituyen la cera emulsionante, y éstos junto con el aceite y la grasa constituyen la base de pomada emulsionante que forma la fase dispersa oleosa de las formulaciones en crema.

Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos un 30% p/p de un alcohol polihidroxílico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas deseablemente pueden incluir un compuesto que aumenta la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas.

La elección de los aceites o grasas adecuados para una formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas. De esta manera, la crema preferiblemente debe ser no grasa, no debe manchar y debe ser un producto lavable con consistencia adecuada para evitar las fugas desde tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres alquílicos mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como miristato de diisopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP. Éstos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades necesarias. Como alternativa, pueden usarse lípidos con un alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

En la práctica, un compuesto/composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en una formulación adecuada a seres humanos y animales mediante administración tópica o sistémica, incluyendo la vía oral, por inhalación, rectal, nasal, bucal, sublingual, vaginal, colónica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), intracisternal e intraperitoneal. Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del receptor.

“Formas de dosificación farmacéuticamente aceptables” se refiere a formas de dosificación del compuesto de la invención e incluye, por ejemplo, comprimidos, grageas, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas, incluyendo suspensiones, pulverizaciones, inhaladores, comprimidos, pastillas, emulsiones, soluciones, gránulos, cápsulas y supositorios, así como preparaciones líquidas para inyección, incluyendo preparaciones de liposomas. Pueden encontrarse técnicas y formulaciones, en general, en Remington’s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las “formulaciones adecuadas para administración oral” pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos que contienen, cada uno, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Los ingredientes activos también pueden presentarse como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido puede obtenerse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos de compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden obtenerse por moldeo en

ES 2 325 481 T3

una máquina adecuada de una mezcla de los compuestos en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente pueden recubrirse o marcarse y se pueden formular para proporcionar la liberación lenta o controlada del ingrediente activo contenido en los mismos.

5 Las composiciones sólidas para administración rectal incluyen supositorios formulados de acuerdo con procedimientos conocidos y que contienen al menos un compuesto de la invención.

10 Si se desea, y para una distribución más eficaz, los compuestos pueden microencapsularse o unirse a un sistema de liberación lenta o de liberación dirigida tal como una matriz polimérica biodegradable biocompatible (por ejemplo, poli (d,l-lactida co-glicolida)), liposomas y microesferas e inyectarse por vía subcutánea o intramuscular por una técnica denominada depósito subcutáneo o intramuscular para proporcionar la liberación lenta continua del compuesto o los compuestos durante un período de 2 semanas o más. Los compuestos pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene bacterias o incorporando agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso.

15 “Formulaciones adecuadas para administración nasal o por inhalación” significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse por vía nasal o por inhalación a un paciente. La formulación puede contener un vehículo, en forma de polvo, que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partículas en un intervalo comprendido entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tales como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.). Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para la administración, por ejemplo, como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Pueden prepararse formulaciones adecuadas para la administración en aerosol de acuerdo con procedimientos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos. La terapia por inhalación se administra fácilmente por medio de inhaladores dosificadores.

20 “Formulaciones adecuadas para administración oral” significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse por vía oral a un paciente. Las formulaciones pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos que contienen, cada uno, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos, como una solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

25 “Formulaciones adecuadas para administración parenteral” significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse por vía parenteral a un paciente. Las formulaciones son estériles e incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones de inyección acuosas y no acuosas que puede contener agentes de suspensión y agentes espesantes y anti-oxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica y tienen un pH ajustado de forma adecuada, con la sangre del receptor para el que están destinadas.

30 “Formulaciones adecuadas para administraciones rectales o vaginales” se refiere a formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse por vía rectal o vaginal a un paciente. La formulación preferiblemente está en forma de supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a las temperaturas normales pero líquidos a la temperatura ambiente y, por lo tanto, se funden en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el componente activo.

35 “Formulaciones adecuadas para administración sistémica” significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse por vía sistémica a un paciente. La formulación preferiblemente se administra por inyección, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los compuestos de la invención se formulan en soluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos, o los compuestos pueden administrarse por vía oral. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Estos penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, sales biliares y derivados de ácido fusídico para la administración transmucosa. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la infiltración. La administración transmucosa puede realizarse por medio del uso de pulverizaciones nasales, por ejemplo, o supositorios. Para administración oral, los compuestos se formulan en formas de administración oral convencionales tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

40 “Formulaciones adecuadas para administración tópica” significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse tópicamente a un paciente. La formulación puede presentarse como una pomada tópica, ungüentos, polvos, pulverizaciones e inhalantes, geles (basados en agua o alcohol) o cremas, como se conoce generalmente en la técnica, o puede incorporarse en una base de matriz para la aplicación en un parche, lo cual permite la liberación controlada del compuesto a través de la barrera transdérmica. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible con agua. Como alternativa, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua. Las permutaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oftálmicas en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para

la administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

5 “Forma de dosificación sólida” significa que la forma de dosificación del compuesto de la invención es una forma sólida, por ejemplo cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grageas o gránulos. En estas formas de dosificación sólidas, el compuesto de la invención se mezcla con al menos un excipiente inerte habitual (o vehículo) tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o diluyentes tales como, por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, (c) humectantes tales como, por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes tales como, por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardadores de la solución tales como, por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de la absorción tales como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes tales como, por ejemplo, caolín y bentonita, (i) lubricantes tales como, por ejemplo, talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, (j) agentes opacificadores, y (k) agentes tamponantes y agentes que liberan el o los compuesto de la invención en una cierta parte del tracto intestinal de una manera retardada.

20 Los niveles de dosificación reales del ingrediente o ingredientes activos en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener una cantidad de ingrediente o ingredientes activos que sea eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y procedimiento de administración particular para un paciente. Un nivel de dosificación seleccionado para cualquier paciente particular, por lo tanto, depende de una diversidad de factores que incluyen el efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento, la etiología y la gravedad de la enfermedad, el estado del paciente, el peso, sexo, dieta y edad, el tipo y potencia de cada ingrediente activo, las velocidades de absorción, metabolismo y/o excreción y otros factores.

30 La dosis diaria total de los compuestos de la presente invención administrada a un paciente en una sola dosis o en dosis divididas puede estar en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg/día. Por ejemplo, en un adulto, las dosis generalmente son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día por inhalación, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferiblemente de 0,1 a 70, más especialmente de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día por administración oral y de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal al día por administración intravenosa. El porcentaje de ingrediente activo en una composición puede variarse, aunque debe constituir una proporción tal que se obtenga una dosificación adecuada. Las composiciones de dosificación unitaria pueden contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas como pueden usarse para constituir la dosis diaria. Evidentemente, pueden administrarse varias formas de dosificación unitarias aproximadamente al mismo tiempo. Una dosificación puede administrarse tan frecuentemente como sea necesario para obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder rápidamente a una dosis mayor o menor y pueden encontrar adecuadas dosis de mantenimiento mucho más débiles. Para otros pacientes, puede ser necesario tener tratamientos a largo plazo en una proporción de 1 a 4 dosis al día de acuerdo con los requisitos fisiológicos de cada paciente particular. No necesita decirse que, para otros pacientes, no será necesario prescribir más de una o dos dosis al día.

45 Las formulaciones pueden prepararse en forma de dosificación unitaria por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Estos procedimientos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después si es necesario dando forma al producto.

50 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de una sola dosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente con tapones elastoméricos y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo necesita la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de un polvo, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

Los compuestos dentro del alcance de la presente invención presentan actividades farmacológicas destacadas de acuerdo con los ensayos descritos en la bibliografía y más adelante, donde los resultados de dichos ensayos se cree que se correlacionan con la actividad farmacológica en seres humanos y otros mamíferos.

60 *Procedimiento de ensayo enzimático in vitro*

Inhibición de la Serina Proteasa NS3 de VHC

65 Se expresó el dominio de proteasa NS3 de VHC y se purificó como se ha descrito previamente (Vertex, publicación PCT W098/17679; que se incorpora en este documento por referencia). El sustrato peptídico cromogénico EDVVA-buC-p-nitroanilida y el fragmento de cofactor NS4A (-KKGSVVIVGRIVLSGK-) para la proteasa NS3 se sintetizó por encargo por American Peptide Corp (Ca). Los compuestos de la presente invención se ensayaron con respecto a

su capacidad de inhibir la actividad proteasa NS3 de VHC usando un ensayo espectrofotométrico con EDVVAbuC-p-nitroanilida como sustrato. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos usando un lector SpectraMax250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con capacidad cinética. La escisión del sustrato EDVVAbuC-p-nitroanilida (500 μ M) por la proteasa NS3 de VHC purificada (0,5 μ M) se realizó a 30°C en el tampón que contenía
 5 fragmento de NS4A 30 μ M, Hepes 46 mM, pH 8,0, NaCl 92 mM, glicerol al 18%, DTT 5 mM y DMSO al 7,5% en ausencia o presencia del compuesto de ensayo. La reacción se controló con respecto a la liberación de pNA (p-nitroanilina) a 405 nm.

La determinación de los parámetros cinéticos incluyendo V_{max} , K_m y V_{max}/K_m se realiza en las condiciones descritas anteriormente. Los valores de K_i se calculan a partir de los gráficos de velocidad frente [inhibidor] a concentraciones fijas de enzima y sustrato, por medio de un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de los datos a la ecuación de Morrison para una inhibición competitiva de unión fuerte [J. F. Morrison, Biochem. Biophys. Acta. 185 269-286 (1969)]. Para este procedimiento se usa el programa Prism (GraphPad Software, Inc.).

Los inhibidores de serina proteasa de VHC descritos en este documento pueden usarse en combinación con otras moléculas que presentan directamente o inducen indirectamente una actividad anti-VHC profilácticamente en pacientes con riesgo de contraer una infección por VHC o para tratar pacientes que ya están infectados. La expresión “anti-actividad de VHC” se refiere a la capacidad de una molécula, cuando está presente, de inhibir completamente o reducir la acumulación de viriones de VHC en comparación con la acumulación de viriones de VHC en ausencia de dicha molécula, y/o la capacidad de una molécula de reducir o mejorar afecciones o síntomas asociados con la infección o patogénesis por VHC en pacientes. Las moléculas que tienen actividad anti-VHC incluyen las que interrumpen una o más etapas en la infección o replicación por VHC, así como las que inducen acciones inmunomoduladoras y antiproliferativas en las células hospedadoras. Las moléculas que tienen actividad anti-VHC pueden inhibir acontecimientos de replicación específicos de VHC tales como, pero sin limitación, síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos dirigida a VHC. Las etapas de replicación de VHC en las que pueden actuar moléculas que tienen actividad anti-VHC incluyen la entrada en la célula (por ejemplo unión; penetración); descapsulación y liberación del genoma de VHC; replicación del genoma de VHC (por ejemplo replicación de cualquier cadena del genoma de ARN viral; transcripción del ARN mensajero viral); traducción de proteínas de VHC; modificación postraduccional de proteínas de VHC (por ejemplo, escisión proteolítica; glicosilación); transporte intracelular de proteínas virales; montaje de los componentes del virión; y liberación de partículas virales (por ejemplo, gemación). Las clases de moléculas que tienen actividad antiviral incluyen, pero sin limitación, receptores “señuelo” solubles y anticuerpos anti-receptor; bloqueantes de canales iónicos, estabilizadores de la cápsida e inhibidores de proteínas de fusión; inhibidores de polimerasas virales, transcriptasa inversa, helicasa, primasa o integrasa; oligonucleótidos antisentido y ribozimas; agentes inmunomoduladores e inmunostimuladores, incluyendo citoquinas tales como interferones, así como agonistas peptídicos, esteroides y fármacos clásicos tales como levamisol; inhibidores de proteínas reguladoras; inhibidores de proteasa; inhibidores del ensamblaje de proteínas; y anticuerpos antivirales y linfocitos citotóxicos. La expresión “cantidad eficaz anti-VHC” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto, o combinación de compuestos como se describen en este documento, eficaz para reducir o mejorar las afecciones o síntomas asociados con la infección por VHC o la patogénesis asociada en pacientes, o para reducir los niveles virales *in vitro* o *in vivo*. Las aplicaciones *in vitro* incluyen el Sistema de Ensayo de Replicación descrito más adelante donde dichas cantidades son eficaces para reducir la acumulación de ARN del replicón de VHC y/o la acumulación de proteínas codificadas por genes contenidos en su interior.

Los compuestos que tienen actividad anti-VHC contemplados para uso en las composiciones y procedimientos de terapia combinada descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, moléculas inmunomoduladoras, incluyendo citoquinas inmunostimuladoras y otros compuestos que se sabe que tienen actividad antiviral para VHC, tales como diversos nucleósidos y nucleótidos antivirales.

Las moléculas inmunomoduladoras contempladas para uso en combinación con los inhibidores de serina proteasa de VHC descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, interferón-alfa 2B (Intron A. Schering Plough); Rebatron (Schering Plough. Interferon-alfa 2B + Ribavirina); interferón alfa pegilado (Reddy, K.R. *et al.* Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 33. 433-438 (2001)), interferón consenso (Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. & Chen, D. S. Efficacy of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol, Hepatol*, 15, 1418-1423 (2000)); interferón alpha-2A (Roferon A; Roche); linfoblastoide o interferón “natural”; interferón tau (Clayette, P. *et al.* IFN-tau, a new interferon type I with antiretroviral activity, *Pathol. Biol. (Paris)* 47, 553-559 (1999)); interleuquina 2 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); Interleuquina 6 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); interleuquina 12 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); ribavirina y compuestos que potencian la aparición de una respuesta de células T coadyuvantes de tipo I (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)). Los interferones pueden mejorar las infecciones virales ejerciendo efectos antivirales directos y/o modificando la respuesta inmune a la infección. Los efectos antivirales de los interferones a menudo están mediados por la inhibición de la penetración viral o la descapsulación, síntesis del ARN viral, traducción de proteínas virales y/o el ensamblaje y la liberación de virus.

Los compuestos que estimulan la síntesis de interferón en las células (Tazulakhova, E.B., Parshina, O.V., Gusev, T.S. & Ershov, F.I. Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers.

J. Interferon Cytakine Res. 21, 65-73)) incluyen, pero sin limitación, ARN bicatenario, solo o en combinación con tobramicina e imiquimod (3M Pharmaceuticals) (Sauder, D.N. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. J. Am. Acad. Dermatol. 43, S6-11 (2000)).

5 Otros compuestos que se sabe que tienen o que puedan tener actividad antiviral contra VHC gracias a mecanismos no inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, ribavirina (ICN Pharmaceuticals); inhibidores de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (VX-497, que se está desarrollando por Vertex Pharmaceuticals); amantadina y rimantadina (Younossi, A.M. and Perillo, R.P. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, NSAIDs, alone or
10 in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 95-102 (1999)); LY217896 (Patente de Estados Unidos 4.835.168) (Colacino, J.M. *et al.* Evaluation of the anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamide (1.Y217896) and its sodium salt. Amimicrobial Agents & Chemotherapy 34, 2156-2163 (1990)) y éster metílico del ácido 9-hidroxiimino-6-metoxi-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-fenantreno-1-carboxílico; clorhidrato de éster metílico del ácido 6-metoxi-1,4a-dimetil-9-(4-metil-piperazina-1-ilimino)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantreno-1-carboxílico; 1-(2-cloro-fenil)-3-(2,2-difenil-etil)-urea (Patente de
15 Estados Unidos N° 6.127.422).

Las formulaciones, dosis y vías de administración para las moléculas anteriores se enseñan en las referencias citadas más adelante o son bien conocidas en la técnica como se describe, por ejemplo, en F.G. Hayden, en Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Novena Edición, Hardman *et al.*, Eds., McGraw-Hill, New York (1996). Capítulo 50, páginas 1191-1223, y las referencias citadas en este documento. Como alternativa, una vez
20 que se ha identificado un compuesto que presenta actividad antiviral contra VHC, puede determinarse una cantidad farmacéuticamente eficaz de ese compuesto usando técnicas que son bien conocidas para el especialista en la técnica. Véase, por ejemplo, Benet *et al.*, en Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Novena Edición, Hardman *et al.*, Eds., McGraw-Hill, New York (1996). Capítulo 1, páginas 3-27, y las referencias citadas en este
25 documento. De esta manera, las formulaciones, intervalos de dosificación y regímenes de dosificación apropiados de dicho compuesto pueden determinarse fácilmente por procedimientos rutinarios.

Las combinaciones de fármacos de la presente invención pueden proporcionarse a una célula o células, o a un paciente humano, en formulaciones farmacéuticamente aceptables separadas administradas simultánea o secuencialmente, en formulaciones que contienen más de un agente terapéutico, o por una diversidad de formulaciones de un solo agente o múltiples agentes. Sin embargo, estas combinaciones de fármacos una vez administradas forman una
30 cantidad eficaz de componentes contra VHC.

Actualmente se dispone de un gran número de otros inmunomoduladores e inmunoestimuladores que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención e incluyen: AA-2G: dipéptido de adamantilamida; adenosina desaminasa. Enzon; adyuvante, Alliance; adyuvantes, Ribic; adyuvantes. Vaxcel; Adjuvax; agelasphin-11; terapia para el SIDA. Chiron; algal glucan, SRI; algammulin. Anutech; Anginlyc; factores anticelulares, Yeda; Anticort; inmunógeno antigastrin-17, Ap: sistema de liberación de antígeno. Vac; formulación de antígeno, IDBC; inmunógeno antiGnRH, Apton; Antiherpin; Arbidol; azarole; Bay-q-8939; Bayr-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001, BL-009; Broncostat; Cantastim; CDR1-84-246; cefodizime; inhibidores de quimioquinas. ICOS; péptidos de CMV, City of Hope; CN-5888; agente de liberación de citoquinas, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; JO7B; IOIA; IOIZ; ditiocarb
40 sódico, ECA-10-142; ELS-1; endotoxina, Novartis, FCE-20696; FCE-24089; FCE-24578; ligando FLT-3, Immune; FR-900483; FR-900494; FR-901235; proteínas G FTS-Zn, Cadus; gludapcin; glutaurina; glycophosphopeptical; GM-2; MM-53; GMDP; vacuna de factor de crecimiento, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; vacuna de *Helicobacter pylori*, factor inmune específico de herpes; terapia para VIH, United Biomed; HyperGAM+CF; Immu-Max; Immu BCG; terapia inmune, Connective; inmunomodulador, Evans; inmunomoduladores, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; inosine pranobex; interferón, Dong-A (alfa2); interferón, Genentech (gamma), interferón, Novartis (alfa), interleuquina-12, Genetics Ins; interleuquina-15, Immunex; interleuquina-16, Research Cor; ISCAR-1; JOO5X, L-644257; ácido licomarasmínico; LipoTher, L-409, LK-410, LP-2307; LT(R1926), LW-50020, MAF, Shionogi; derivados de MDP, Merck, met-enkefalina, TNT; metilfulirilbutirolactonas; MIMP; mirimostim; vacuna bacteriana mixta, Tem; MM1; moniliastat; MPLA, Ribic; EM-705; murabutide; murabutide, Vacsyn; derivado de muramil dipéptido; derivados de muramil péptido myelopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT- 16416; NT-002, AP-485; PEFA-814; péptidos, Scios; peptidoglicano, Pliva; Perthon, Advanced Plant; derivado de PGM, Pliva; Pharmaprojects
50 N° 1099; N° 1426; N° 1349; N° 1585; N° 1607; N° 1710; N° 1779; N° 2002; N° 2060; N° 2795; N° 3088; N° 3111; N° 3345; N° 3467; N° 3668; N° 3998; N° 3999; N° 4089; N° 4188; N° 4451; N° 4500; N° 4689; N° 4833; N° 494; N° 5217; N° 530; pidotimod; pimelautide; pinafide; ipodofilotoxina PMD-589, Conpharm; POL-509; poly-ICLC; poly-ICLC, Yamasa Shoyu; polisacárido A PolyA-PolyU; proteína A, Berlox Bioscience; PS34WO: MAb de *Pseudomonas*, Teijin; Psomaglobin; PTL-78419 Pyrexol; piriferona; Retrogen; Retropep; RG-003; Rhinostat; rifamaxil; RM-06; Rollin; romurtide; RU-40555; RU-41821; anticuerpos de *Rubella*. ResCo; S-27609; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL-953; SK&F-107647; SL04; SL05; SM-4333; Solutein; SRI-62-834; SRL-172; ST-570; ST-789; staphage lysate; Stimulon; supresina; T-150RI; T-LCEF; tabilautide; temurtide; Theradigm-HBV; Theradigm-HPV; Theradigm-HSV; THF. Pharm & Upjohn; THF. Yeda; thymalfasin; fracciones de hormona tímica; thymocartin; timolinfortropina; timopentina; analogos de timopentina; timopentina, Peptech; fracción de timosina 5, Alpha; timoestimulina; timotrinan; TMD-23; TO-115; factor de transferencia, Viragen; tuftsin. Selavo; ubenimex; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IF-A-2+; IF-B+; LP-G-+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-12+; IL-15+; IM+; LHRH-; LIPCOR+L LYM-B+; LYM-Nk+; LYM-T+; OPI+; PEP+; PHG-MA+; RNA-SYN-; SY-CW-; TH-A-1+; TH-5+; THF+; UN.

ES 2 325 481 T3

Los compuestos nucleosídicos y nucleotídicos representativos útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación:

- (+) -cis-5-fluoro-1-[2-(hidroxi-metil)-1,3-oxatiolan-5-il]citosina;
- (-) -2'-desoxi-3'-tincitidina-5'-trifosfato (3TC);
- 5 (-) -cis-5-fluoro-1-[2-(hidroxi-metil)-[1,3-oxatiolan-5-il]citosina (FTC);
- (-) 2',3',didesoxi-3'-tiacitidina[(-)-Sddc];
- 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosina (FIAC);
- 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosinatrifosfato (FIACTP);
- 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil-5-metiluracilo (FMAU);
- 10 1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida;
- 2',3'-didesoxi-3'fluoro-5-metil-dexocitidina (FddMeCyt);
- 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metil-dexocitidina (ClddMeCyt);
- 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metil-dexocitidina (AddMeCyt);
- 2',3'-didesoxi-3'-fluoro-5-metil-citidina (FddMeCyt);
- 15 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metil-citidina (ClddMeCyt);
- 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metil-citidina (AddMeCyt);
- 2',3'-didesoxi-3'-fluorotimidina (FddThd);
- 2',3'-didesoxi-beta-L-5-fluorocitidina (beta-L-FddC);
- 2',3'-didesoxi-beta-L-5-tiacitidina;
- 20 2',3'-didesoxi-beta-L-5-citidina (beta-L-ddC);
- 9-(1,3-dihidroxi-3-propoximetil)guanina;
- 2'-desoxi-3'-tia-5-fluorocitosina-3-amino-5-metil-dexocitidina (AddMeCyt);
- 2-amino-1,9-[(2-hidroxi-metil-1-(hidroximetil)etoxi)metil]-6H-purina-6-ona (ganciclovir);
- diacetato de 2-(2-amino-9H-purin-9-iletel)-1,3-propanil (famciclovir);
- 25 2-amino-1,9-dihidro-9-[(2-hidroxi-etoxi)metil]6H-purina-6-ona (aciclovir);
- 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-but-1-il)guanina (penciclovir);
- diacetato de 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-but-1-il)-6-desoxi-guanina (famciclovir);
- 3'-ácido-3'-desoxitimidina (AZT); 3'-cloro-5-metil-dexocitidina (ClddMeCyt);
- 9-(2-fosfonilo-metoxietil)-2',6'-diaminopurina-2',3'-didesoxirribósido;
- 30 9-(2-fosfonilmetiloxietil)adenina (PMEA); aciclovir trifosfato (ACVTP);
- D-carbociclo-2-desoxiguanosina (CJG); didesoxi-citidina; didesoxi-citosina (ddC);
- didesoxi-guanina (DDG); didesoxi-inosina (ddI);
- E-5-(2-bromovinil)-2-desoxiuridina trifosfato;
- fluoro-arabinofuranosil-yodouracilo;
- 35 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosil)-5-indo-uracilo (FIAU);
- estavudina: 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purina-6-amina monohidrato (Ara-A);
- 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purina-6-amino-5'-monofosfato monohidrato (Ara-AMP);
- 2-desoxi-3'-tia-5-fluorocitidina;
- 2',3'-didesoxi-guanina; y 2',3-didesoxi-guanosina.

40

Los procedimientos de síntesis para la preparación de nucleósidos y nucleótidos útiles en la presente invención son bien conocidos en la técnica como se describe en Acta Biochim. Pol., 43, 25-36 (1996); Swed. Nucleosides Nucleolides 15, 361-378 (1996), Synthesis 12, 1465-1479 (1995); Carbohyd. Chem. 27, 242-276 (1995); Chem. Nucleosides 45 Nucleotides 3, 421-535 (1994), Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press; and Exp. Opin. Invest. Drugs 4, 95-115 (1995).

Las reacciones químicas descritas en las referencias citadas anteriormente generalmente se describen en términos de su aplicación más amplia a la preparación de los compuestos de la presente invención. Ocasionalmente, las reacciones pueden no ser aplicables como se describe a cada compuesto incluido dentro del alcance de los compuestos descritos en este documento. Los compuestos para los que esto ocurre se reconocerán fácilmente por los especialistas en la técnica. En todos estos casos, las reacciones pueden realizarse satisfactoriamente por modificaciones convencionales conocidas para los especialistas en la técnica, por ejemplo, por medio de una protección apropiada de grupos interferentes, por cambio a reactivos convencionales alternativos, por modificación rutinaria de las condiciones de reacción y similares, o a la preparación de los compuestos correspondientes de la presente invención serán aplicables otras reacciones descritas en este documento o convencionales de otra forma. En todos los procedimientos preparativos, todos los materiales de partida son conocidos o se pueden preparar fácilmente a partir de materiales de partida conocidos.

Aunque los análogos de nucleósidos generalmente se emplean como agentes antivirales tal cual, los nucleótidos (nucleósido fosfatos) algunas veces tienen que convertirse en nucleósidos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Un ejemplo de un nucleótido modificado químicamente capaz de entrar en las células es S-1-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropilcitosina HPMPC, (Gilead Sciences). Los compuestos nucleosídicos y nucleotídicos de la presente invención que son ácidos pueden formar sales. Los ejemplos incluyen sales con metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, calcio o magnesio, o sales con bases orgánicas o sales básicas de amonio cuaternario.

65

Los inmunomoduladores e inmunoestimuladores útiles en los procedimientos de terapia combinada de la presente invención pueden administrarse en cantidades menores que las que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, el interferón alfa típicamente se administra a seres humanos para el tratamiento de infecciones por VHC en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 10×10^6 unidades/persona tres veces por semana (Simon *et al.*, Hepatology 25:445-448 (1997)). En los procedimientos y composiciones de la presente invención, esta dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente $7,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana; más preferiblemente de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 5×10^6 unidades/persona tres veces por semana; más preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 3×10^6 unidades/persona tres veces por semana. Debido a la mayor eficacia antiviral contra el virus de la hepatitis C de los inmunomoduladores e inmunoestimuladores en presencia de los inhibidores de la serina proteasa de VHC de la presente invención, en los procedimientos y composiciones descritos en este documento pueden emplearse cantidades reducidas de estos inmunomoduladores/inmunoestimuladores. De forma similar, debido a la mayor eficacia antiviral contra el virus de la hepatitis C de los inhibidores de serina proteasa de VHC de la presente invención en presencia de inmunomoduladores e inmunoestimuladores, en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden emplearse cantidades reducidas de estos inhibidores de serina proteasa de VHC. Estas cantidades reducidas pueden determinarse por un control rutinario de los títulos de virus de hepatitis C en pacientes infectados sometidos a terapia. Esto puede realizarse, por ejemplo, controlando el ARN de VHC en el suero de los pacientes por transferencia en ranura (slot-blot), transferencia puntual (dot-blot) o técnicas de RT-PCR, o por medición de antígenos de la superficie de VHC u otros antígenos. De forma similar, puede controlarse a los pacientes durante la terapia combinada empleando los inhibidores de serina proteasa de VHC descritos en este documento y otros compuestos que tienen actividad anti-VHC, por ejemplo, agentes antivirales nucleosídicos y/o nucleotídicos, para determinar las menores dosis eficaces de cada uno cuando se usan en combinación.

En los procedimientos de terapia de combinada descritos en el presente documento, los compuestos antivirales nucleosídicos o nucleotídicos, o mezclas de los mismos, pueden administrarse a los seres humanos en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/persona/día a aproximadamente 500 mg/persona/día; preferiblemente de aproximadamente 10 mg/persona/día a aproximadamente 300 mg/persona/día; más preferiblemente de aproximadamente 25 mg/persona/día a aproximadamente 200 mg/persona/día; incluso más preferiblemente de aproximadamente 50 mg/persona/día a aproximadamente 150 mg/persona/día; y aún más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/persona/día a aproximadamente 50 mg/persona/día.

Las dosis de los compuestos pueden administrarse a un paciente en una sola dosis o en múltiples subdosis proporcionadas. En el último caso, las composiciones de dosificación unitaria pueden contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria. Múltiples dosis al día también pueden aumentar la dosis diaria total si esto se desea por la persona que receta el fármaco.

El régimen para tratar a un paciente que padece una infección por VHC con los compuestos y/o composiciones de la presente invención se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo, dieta y situación médica del paciente, la gravedad de la infección, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, farmacocinética y perfiles toxicológicos de los compuestos particulares empleados, y si se utiliza un sistema de administración de fármaco. La administración de las combinaciones de fármaco descritas en este documento debe continuarse generalmente durante un período de varias semanas a varios meses o años hasta que los títulos de virus alcancen niveles aceptables, que indiquen que la infección se ha controlado o erradicado. Los pacientes sometidos a tratamiento con las combinaciones de fármacos descritas en este documento pueden controlarse rutinariamente midiendo el ARN del virus de la hepatitis en el suero de los pacientes por técnicas de transferencia por ranuras, transferencia puntual o RT-PCR o midiendo los antígenos del virus de la hepatitis C, tales como antígenos superficiales, en el suero para determinar la eficacia de la terapia. El análisis continuo de los datos obtenidos por estos procedimientos permite la modificación del régimen de tratamiento durante la terapia de forma que se administren cantidades óptimas de cada componente en la combinación, y de esta forma también puede determinarse la duración del tratamiento. De esta manera, el régimen de tratamiento/programa de dosificación puede modificarse racionalmente durante el transcurso de la terapia de forma que se administren las menores cantidades de cada uno de los compuestos antivirales usados en combinación que conjuntamente presentan eficacia contra el virus de la hepatitis C satisfactoria y de forma que la administración de esos compuestos antivirales en combinación se continúe sólo cuando sea necesario para tratar satisfactoriamente la infección.

La presente invención incluye el uso de inhibidores de serina proteasa de VHC descritos en este documento en diversas combinaciones con los tipos anteriores y similares de compuestos que tienen actividad anti-VHC para tratar o prevenir infecciones por VHC en pacientes. Por ejemplo, pueden usarse uno o más inhibidores de serina proteasa de VHC en combinación con: uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-VHC; uno o más compuestos distintos de interferón que tienen actividad anti-VHC; uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-VHC y uno o más compuestos no interferón que tienen actividad anti-VHC. Cuando se usan en combinación para tratar o prevenir una infección por VHC en un paciente humano, cualquiera de los inhibidores de serina proteasa de VHC descritos en el presente documento y los compuestos anteriores que tienen actividad anti-VHC pueden estar presentes en una cantidad farmacéutica o eficaz contra VHC. Gracias a sus efectos aditivos o sinérgicos, cuando se usan en las combinaciones descritas anteriormente, cada uno también puede estar presente en una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz o eficaz anti-VHC, es decir, una cantidad que si se usa sola, proporciona una eficacia farmacéutica en la inhibición completa o reducción de la acumulación de viriones

de VHC y/o en la reducción o mejora de las afecciones o síntomas asociados con la infección o la patogénesis de VHC en los pacientes menor que dichos inhibidores de serina proteasa de VHC y compuestos que tienen actividad anti-VHC cuando se usan en cantidades farmacéuticamente eficaces. Además, la presente invención incluye el uso de combinaciones de inhibidores de serina proteasa de VHC y compuestos que tienen actividad anti-VHC como se ha descrito anteriormente para tratar o prevenir infecciones por VHC, donde uno o más de estos inhibidores o compuestos está presente en una cantidad farmacéuticamente eficaz y el otro u otros inhibidores o compuestos están presentes en una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica o una cantidad eficaz anti-VHC debido a sus efectos aditivos o sinérgicos. Como se usa en este documento, el término “efecto aditivo” describe el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos que es igual a la suma del efecto de cada agente administrado individualmente. Un efecto sinérgico es uno en que el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos es mayor que la suma del efecto de cada agente administrado solo.

Ejemplo 42

La terapia actual convencional para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es el tratamiento con el inmunomodulador alfa-interferón (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Esta terapia es ineficaz en la mayoría de los pacientes con VHC, que no muestran respuesta o presentan una recaída después de una terapia prolongada con interferón. Además, hay varios efectos secundarios severos asociados con la terapia con interferón. En vista de la apremiante necesidad de nuevos fármacos antivirales más eficaces para tratar pacientes infectados con VHC, los presentes inventores han desarrollado una serie de compuestos que inhiben la serina proteasa de VHC (un complejo de proteínas NS3 y NS4A del virus VHC). Estos compuestos pueden usarse solos, juntos entre sí y en combinación con otras clases de compuestos para tratar o prevenir la infección por VHC. Este ejemplo describe el ensayo de tres inhibidores representativos de serina proteasa de VHC, es decir, el Compuesto CU, el Compuesto Comparativo EP y el Compuesto Comparativo EC, solos y en combinación con miembros individuales de una serie de interferones (interferón alfa-2B (Schering Plough), interferón alfa-2A (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), interferón beta (Research Diagnostics Inc, Flandes, NJ) e interferón ovino tau (Research Diagnostics Inc, Flandes, NJ)) en un ensayo de replicón de ARN subgenómico de VHC (Replicon Assay) para determinar si los dos compuestos actúan de acuerdo para disminuir la acumulación de ARN de VHC. El Ensayo de Replicón mide la cantidad de ARN subgenómico de VHC (replicón R que queda en las células que contienen replicón (Lohmann *et al.* Sciences 285: 110-113 (1999)) después de dos días de tratamiento con fármaco con respecto a la cantidad de ARN de replicón en las células no tratadas. En este ensayo la potencia de los compuestos como fármacos antivirales contra VHC es directamente proporcional al nivel de inhibición de acumulación del ARN del replicón.

Los dos fármacos se ensayan en combinaciones en el sistema de Ensayo de Replicón *in vitro* para determinar si, cuando se usan juntos, presentan actividad anti-VHC aditiva o sinérgica. El Ensayo de Replicón se emplea como un modelo sustituto para la infección por VHC *in vitro* para evaluar los efectos combinados del inmunomodulador, por ejemplo, interferón-alfa 2B (Intron A), Schering Plough) y el inhibidor de serina proteasa de VHC, por ejemplo Compuesto CU. Como se muestra más adelante, los resultados demuestran que hay un claro efecto sinérgico anti-VHC de estos dos tipos de fármacos, que se mide usando determinaciones matemáticas formales de sinergia para analizar su capacidad para reducir los niveles de ARN de VHC en el Ensayo de Replicón.

45 El Ensayo de Replicón

El Ensayo de Replicón que emplea una línea celular que contiene el ARN subgenómico de VHC auto-replicativo (replicón) se describe en Lohmann *et al.* Science 285:110-113 (1999). El número de acceso del Genbank para la secuencia del replicón usado en los experimentos descritos en este documento se presenta en esta referencia como AJ242654. Este documento describe procedimientos para la transcripción *in vitro* de ARN a partir del ADNc del replicón, la transfección del ARN del replicón en células Huh7 por electroporación y la selección de las células que contienen el ARN del replicón usando el antibiótico G418. Las células Huh7 son una línea celular de hepatoma obtenidas del Dr. William Mason en Fox Chase Cancer Research Center (Filadelfia). Estas células están disponibles públicamente en Fox Chase y se han descrito extensivamente en la bibliografía científica (Nakabayashi *et al.* Cancer Res. 42:3858-3863 (1982)). En los experimentos descritos en este documento, todo el ADN de la plantilla se retira de la preparación de ARN de replicón transcrito *in vitro* antes de la electroporación de este ARN en células Huh7 por múltiple tratamiento con DNasa (tres tratamientos secuenciales).

El Ensayo de Replicón se realiza como se describe con detalle más adelante. En resumen, se ponen células de replicón en bandejas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo y se incuban a 37°C. Las células se incuban en DMEM (Medio Esencial Mínimo de Dulbecco) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina, aminoácidos no esenciales y el antibiótico G418 (0,25 mg/ml). Después de la incubación durante una noche, el medio se reemplaza por DMEM que contiene suero bovino fetal al 2% y diversas concentraciones del inhibidor de serina proteasa, tal como el Compuesto CU, y/o un interferón tal como el interferón alfa 2B (Intron A, Schering Plough). Cada compuesto se ensaya a seis-ocho concentraciones diferentes. Para un extremo del intervalo de concentraciones, se seleccionan concentraciones elevadas de los compuestos que darán como resultado una inhibición casi completa de la acumulación de ARN del replicón después de dos días de tratamiento. A partir de estas concentraciones de partida, se realizan diluciones seriadas de forma que los intervalos de concentraciones ensayados en el Ensayo de

ES 2 325 481 T3

Replicación incluyan concentraciones a las que los compuestos son muy eficaces, así como concentraciones a las que no hay un efecto significativo. Cada concentración de inhibidor de serina proteasa de VHC se ensaya sin ningún interferón añadido, así como con la adición de seis a ocho dosis de interferones diferentes. De forma similar, el interferón se ensaya sin ningún inhibidor de serina proteasa de VHC añadido. Después de 48 horas de incubación con los compuestos, el medio se retira de las placas y se extrae el ARN celular total de las células usando el kit RNeasy-96 fabricado por Qiagen Inc. (Valencia CA). Este ARN después se analiza por RT-PCR cuantitativa, o TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City CA). La diana de RT-PCR TaqMan® es el gen de resistencia a neomicina en el ARN del replicón. Las placas se configuran de forma que haya 5 réplicas de cada muestra de tratamiento de fármaco y 16 réplicas de las muestras no tratadas. Esto permite mayor confianza estadística en los datos de la RT-PCR cuantitativa.

El análisis de los datos del Ensayo de Replicación produce dos valores que son útiles para evaluar la potencia de posibles agentes antivirales contra VHC. A cada concentración de compuesto ensayada, se determina el nivel de inhibición en la acumulación de ARN de replicación causada por el compuesto durante dos días de tratamiento con respecto a la cantidad de ARN de replicación en las células no tratadas. Esto se presenta como porcentaje de inhibición. Cuando se ha obtenido una serie de puntos de datos generados por tratamientos de las células a un intervalo de concentraciones, se generan valores de CI_{50} , es decir, la concentración de compuesto a la que la acumulación de ARN de replicación de VHC se reduce en un 50% por el compuesto. Por medio del ensayo repetido de los inhibidores de serina proteasa de VHC en el Ensayo de Replicación, se determina que la CI_{50} tiene un porcentaje de coeficiente de variación (%CV o $100\% \times$ desviación típica en CI_{50}/CI_{50} media) de aproximadamente un 20%. La CI_{50} es el valor usado para clasificar los compuestos individuales ensayados en este ensayo basándose en su potencia como agentes antivirales contra VHC. Las determinaciones sencillas de la CI_{50} son inadecuadas para evaluar la utilidad de los compuestos usados en combinación. El análisis más eficaz de la serie de datos generados usando todas las combinaciones de interferones diferentes e inhibidores de serina proteasa requiere la evaluación del porcentaje de inhibiciones que se muestra en la Tabla 7 usando procedimientos matemáticos descritos más adelante que están diseñados para determinar si los tratamientos combinados son agonistas, aditivos o sinérgicos.

A continuación se proporcionan detalles del Ensayo de Replicación:

Procedimiento para el Análisis Cuantitativo de ARN de Replicación de VHC en el Ensayo de Replicación de VHC Usando RT-PCR TaqMan®

El ensayo de replicación se usa para medir la capacidad de posibles compuestos antivirales contra VHC para inhibir la acumulación de una molécula de replicación de ARN subgenómico de VHC en una línea celular Huh7 (Lohmann et al. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). Este ensayo comprende tres componentes funcionales: (1) el mantenimiento de las células de replicación, la preparación de las placas de ensayo y la aplicación del compuesto; (2) extracción del ARN celular total de las células de replicación; y (3) RT-PCR a tiempo real (TaqMan®) para medir la cantidad de ARN de replicación en cada muestra. El Ensayo de Replicación requiere al menos 4 días para realizarse; sin embargo, el procedimiento puede interrumpirse y las muestras congelarse entre las etapas. Cada componente de ensayo se describe más adelante.

1. Mantenimiento de la célula de replicación, preparación de las placas de ensayo y aplicación del compuesto

1.1 Mantenimiento de la línea de células de replicación

La línea celular usada en el Ensayo de Replicación se produce como se describe en Lohmann *et al.* (Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). Después se incuban matraces de cultivo de células de 150 cm² (Costar) que contienen células de replicación a 37°C y con 5% de CO₂ hasta la confluencia, las células se diluyen 1:10, v/v, en matraces de cultivo de células de 150 cm² limpios. El medio es DMEM que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), aminoácidos no esenciales 1X (NEAA), glutamina 1X (Glu) y G418 a 0,25 mg/ml. Se realizan tres pases seriados, cada vez dejando que las células alcancen la confluencia, seguido de dilución de las células en matraces de cultivo de células de 150 cm² limpios. Estas células, denominadas "células originales", después se reparten en alícuotas y se almacenan para el uso futuro en el Ensayo de Replicación. El análisis basado en TaqMan® se realiza para determinar el número de genomas de replicación de VHC por célula, que revela la presencia de ~150 copias del replicón por célula. Esto se basa en la relación de copias de ARN de replicación con respecto al doble de las copias del gen *apoB* humano (número de genomas haploides).

1.1.1 Las células originales se almacenan en N₂ líquido. Para las células usadas en el Ensayo de Replicación, después de 20 pases seriados, las células se abandonan y se revive un lote nuevo a partir del almacenamiento en N₂ líquido.

1.2 Cultivo de células en bandejas de 96 pocillos para el Ensayo de Replicación

1.2.1. Para la preparación de placas de 96 pocillos, se tripsiniza un matraz de 75 cm² con una confluencia del 75% de células que contienen replicación, y se resuspenden en 10 ml de Medio A. La tripsinización se realiza retirando el medio, añadiendo 1 ml de tripsina-EDTA al 0,25%, p/v, y después retirando la tripsina-EDTA. Después de 5-10 minutos, las células se liberan del matraz y se resuspenden en medio.

ES 2 325 481 T3

1.2.2. Las células se cuentan usando un hemacitómetro, y la concentración celular se ajusta a 10^5 células/ml.

1.2.3. Cada pocillo se siembra con $100 \mu\text{l}$ de suspensión celular usando una pipeta multicanal Impact2 (Matrix), nunca cultivando más de cuatro placas de 96 pocillos desde una sola suspensión celular.

1.2.4. Se incuban placas de 96 pocillos a 37°C durante una noche.

1.3. Dilución de compuesto y aplicación en bandejas de células de replicación

1.3.1. Se disuelven compuestos inhibidores de serina proteasa de VHC en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 20 mM. Los interferones se suspenden en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,1% p/v.

1.3.2. La solución de compuesto 20 mM se diluye a 1 mM con DMSO.

1.3.3. Se añaden $50 \mu\text{l}$ de compuesto disuelto en DMSO en 10 ml de Medio B (la concentración del compuesto es 5 mM y la concentración de DMSO es ahora de 0,5%) o se añaden $20 \mu\text{l}$ de compuesto 1 mM y $30 \mu\text{l}$ de DMSO a 10 ml de Medio B (la concentración de compuesto es de $2 \mu\text{M}$).

1.3.4. La dilución de compuesto hasta la concentración final se completa mezclando compuesto/solución de Medio B con Medio C (contiene DMSO al 0,5%). Se realizan de una a cinco diluciones seriadas del compuesto con Medio C en un bloque de polipropileno de 2 ml de 96 pocillos para obtener las concentraciones finales deseadas de compuesto.

1.3.5. La placa celular se retira del incubador de 37°C y se marca en la esquina superior derecha de la tapa y en el lado derecho de la base. El medio se vierte de las placas de 96 pocillos.

1.3.6. Se añaden $100 \mu\text{l}$ de soluciones de compuesto/medio de cada pocillo del bloque de dilución 96 pocillos a la placa de células de 96 pocillos usando una pipeta Impact2.

1.3.7. Se añaden $100 \mu\text{l}$ de medio C a todos los pocillos no tratados de acuerdo con la Tabla 3 para ensayar compuestos a 1,3 ó 6 concentraciones diferentes. "Untx" se refiere a las células tratadas de forma simulada (DMSO añadido a la misma concentración que en las células tratadas) "Con". se refiere a la concentración de compuesto.

TABLA 3

2 Compuestos, 6 concentraciones, 5 réplicas

	Compuesto 1					Compuesto 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx
B	con.1	con.1	con.	con.	con.	con.1	con.1	con.1	con.	con.1	con.1	
			1	1					1			
C	con.2	con.2	con.	con.	con.	con.2	con.2	con.2	con.	con.2	con.2	
			2	2					2			
D	con.3	con.3	con.	con.	con.	con.3	con.3	con.3	con.	con.3	con.3	
			3	3					3			

ES 2 325 481 T3

	E	con.4	con.4	con.	con.	con.4	con.4	con.4	con.	con.4	con.4
				4	4				4		
5	F	con.5	con.5	con.	con.	con.5	con.5	con.5	con.	con.5	con.5
				5	5				5		
10	G	con.6	con.6	con.	con.	con.6	con.6	con.6	con.	con.6	con.6
				6	6				6		
	H	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx

4 Compuestos, 3 concentraciones, 5 réplicas

		Compuesto 1					Compuesto 2						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20	A	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
	B	con.1	con.1	con.1	con.	con.	con.1	con.1	con.1	con.	con.1		
25					1	1				1			
	C	con.2	con.2	con.2	con.	con.	con.2	con.2	con.2	con.	con.2		
					2	2				2			
30	D	con.3	con.3	con.3	con.	con.	con.3	con.3	con.3	con.	con.3		
					3	3				3			
35	E	con.1	con.1	con.1	con.	con.	con.1	con.1	con.1	con.	con.1		
					1	1				1			
	F	con.2	con.2	con.2	con.	con.	con.2	con.2	con.2	con.	con.2		
40					2	2				2			
	G	con.3	con.3	con.3	con.	con.	con.3	con.3	con.3	con.	con.3		
					3	3				3			
45	H	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
	Compuesto 3												
	Compuesto 4												

16 Compuestos, 1 concentración, 4 réplicas

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50	A	untx	com	comp.2	comp.	comp.	comp.5	comp.6	comp.7	comp.8	untx		
			p.1		3	4							
55	B	untx	com	comp.2	comp.	comp.	comp.5	comp.6	comp.7	comp.8	untx		
			p.1		3	4							
60	C	untx	com	comp.2	comp.	comp.	comp.5	comp.6	comp.7	comp.8	untx		
			p.1		3	4							

65

ES 2 325 481 T3

	D	untx	com	comp.2	comp.	comp.	comp.5	comp.6	comp.7	comp.8	untx
			p..1		3	4					
5	E	untx	com	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	untx
			p.9	10	11	12	13	14	15	16	
10	F	untx	com	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	untx
			p.9	10	11	12	13	14	15	16	
15	G	untx	com	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	untx
			p.9	10	11	12	13	14	15	16	
20	H	untx	com	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	untx
			p.9	10	11	12	13	14	15	16	

12 Compuestos, 1 concentración, 5 réplicas

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
30	B	comp1	comp1	comp1	comp.	comp.	comp.7	comp7	comp7	comp7	comp7	comp7	
					1	1							
35	C	comp2	comp2	comp2	comp.	comp.	comp.8	comp8	comp8	comp8	comp8	comp8	
					2	2							
40	D	comp3	comp3	comp3	comp.	comp.	comp.9	comp9	comp9	comp9	comp9	comp9	
					3	3							
45	E	comp4	comp4	comp4	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	
					4	4	10	10	10	10	10	10	
50	F	comp5	comp5	comp5	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	
					5	5	11	11	11	11	11	11	
55	G	comp6	comp6	comp6	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	comp.	
					6	6	12	12	12	12	12	12	
60	H	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
65													

ES 2 325 481 T3

1.4. Las placas se incuban durante 48 horas a 37°C y después a someten a extracción de ARN

TABLA 4

Resumen del equipo y suministros usados para el cultivo celular y la preparación de los compuestos		
Pipeta Impact de 8 canales, 1250 µl	Nº de catálogo 2004	Matrix
Bloque de pocillos profundos de polipropileno de 2 ml, 96 pocillos, estéril	Nº de catálogo 4222	Matrix
Depósitos de reactivos, de 25 ml, estéril	Nº de catálogo 8096	Matrix
Puntas de pipeta Inng X-tra 1250 µl	Nº de catálogo 8255	Matrix
Placa de 96 pocillos	Nº de catálogo 3595	Costar
Hemacitómetro	Línea brillante mejorada. Neubatter, profundidad 0,1 mm.	Reichen
DMEM	Nº de catálogo 51444-798	JRH
L-glutamina (Glu)	Nº de catálogo 12403-010	GIBCO-BRL
Aminoácidos no esenciales (NEAA)	Nº de catálogo 11140-050	GIBCO-BRL
Suero bovino fetal (FBS)	Nº de catálogo 16250-078	GIBCO-BRL
GHS	Nº de catálogo 55-0273	Invitrogen
DMSO	Nº de catálogo D-2650	Sigma
Medio A	DMEM, FBS al 10%, NEAA 1X, Glu 1X, G418 0,25 mg/ml	
Medio B	DMEM, FBS al 2%, NEAA 1X, Glu 1X	
Medio C	DMEM, FBS al 2%, NEAA 1X, Glu 1X, DMSO 0,5%	
Tripsina-EDTA 0,25%	GIBCO-BRL	

2. Extracción de ARN celular total a partir de células que contienen replicón

2.1 Introducción

El objetivo del procedimiento es extraer ARN a partir de muestras de cultivo de tejidos *in vitro* de forma que el ARN viral o celular se recupere cuantitativamente y sea suficientemente puro para analizarse por un ensayo de RT-PCR de VHC cuantitativo.

ES 2 325 481 T3

Para permitir la detección de variaciones en la eficacia de la extracción del ARN, se añaden cantidades convencionales de virus de la diarrea viral bovina (BVDV) un virus de ARN con alguna similitud con VHC, a cada muestra de células antes de la extracción del ARN. De esta manera, el nivel de ARN de BVDV detectado en la reacción RT-PCR múltiple final debe ser consistente entre todos los pocillos dentro de los límites de variabilidad asociados con el Ensayo de Replicón. Este control interno de eficacia de extracción de ARN se discute adicionalmente en la sección de TaqMan® presentada más adelante.

La estrategia de extracción de ARN usada es el procedimiento RNeasy fabricado por Qiagen Inc. (Valencia, CA). Este procedimiento emplea 96 minicolumnas basadas en sílice que están colocadas en una matriz compatible con operaciones de cultivo de tejidos de 96 pocillos. La tecnología de extracción de ARN es una modificación del procedimiento de Boom en el que todas las proteínas y ácidos nucleicos celulares, incluyendo las nucleasas, primero se desnaturalizan con una sal caotrópica fuerte (tiocianato de guanidinio). En este medio, los ácidos nucleicos tienen una fuerte afinidad por la sílice, el material presente en los discos de las minicolumnas; sin embargo, las proteínas y otros contaminantes no se unen a la sílice y pasan a través de las columnas. Después de lavar las columnas con soluciones caotrópicas/etanol, las muestras se secan parcialmente y el ácido nucleico después se libera de la columna en un pequeño volumen de agua.

Para reducir la variabilidad en la recuperación del ARN de VHC, debe tenerse cuidado con las condiciones de lavado y secado parcial de la columna. En todas las fases de este procedimiento es necesaria la presencia de una pequeña cantidad de etanol porque las muestras de partida pueden llevar riesgos biológicos, la sal caotrópica es muy cáustica y, como un tiocianato, puede generar gas cianuro venenoso si se deja en contacto con medios ácidos.

TABLA 5

Resumen del equipo y suministros necesarios para los procedimientos de Extracción de ARN de VHC		
Kit RNeasy 96 (24)	Nº de catálogo 74183	Qiagen
Colector QIAvane 96	Nº de catálogo 19504	Qiagen
Centrífuga 4-15C para 2x96 placas 6000 x g	Nº de catálogo 81010	Qiagen
Rotor de placas para 2x96 placas	Nº de catálogo 81031	Qiagen
Alcohol etílico 200 Proof		
Pipeta Impact2 de 8 canales, 250 µl	Nº de catálogo 2002	Matrix
Pipeta Impact2 de 8 canales, 1250 µl	Nº de catálogo 2004	Matrix
Bloque de pocillos profundos de polipropileno de 2 ml, 96 pocillos, estéril	Nº de catálogo 4222	Matrix
Depósitos de reactivo de 25 ml, estériles	Nº de catálogo 8096	Matrix
Puntas de Pipeta largas X-tra de 1250 µl	Nº de catálogo 8255	Matrix
Puntas de Pipetas de 200 µl	Nº de catálogo 7275	Matrix
medio MEM sin suero	Nº de catálogo 11095-80	GIBCOBRL

ES 2 325 481 T3

2.2 Procedimiento

2.2.1 Lisis Celular

5 2.2.1.1. Preparar tampón de lisis: Para una placa de 96 pocillos, añadir 150 μ l de B-mercaptoetanol (B-ME) y 1 μ l de solución madre de BVDV (agitar vorticialmente la solución madre antes de la adición) a 15 ml de tampón RLT (un componente del kit RNeasy, Qiagen). Esta solución madre se prepara infectando células MDBK (células de riñón de bovino n° CCL-22, disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas VA) con BVDV y recogiendo el cultivo al efecto citopático máximo (CPE). Esta solución madre tiene un título infeccioso de aproximadamente
10 1×10^7 ufc/ml. Esto proporciona a BVDV un ciclo umbral (C_t) de aproximadamente 22 en el ensayo TaqMan®. La solución madre de BVDV se almacena en un congelador a -80°C.

15 2.2.1.2. Las células se lavan con 10 μ l de medio MEM sin suero (programa 4 en una pipeta electrónica de 8 canales, P1250: rellenar 1250, Disp 150 x 8). Se añaden 150 μ l de tampón de lisis a cada pocillo (mismo programa).

2.2.1.3. Se extrae ARN inmediatamente, o las células se congelan a -80°C.

2.2.2. Preparación de reactivos y materiales para la extracción del ARN

20 2.2.2.1. Anotar el número de lote del RPE y del Kit RNeasy 96.

2.2.2.2. RPE: se añaden 720 ml de etanol al 100% a un frasco de RPE (Qiagen) y se mezcla bien; los frascos de RPE siempre se agitan bien antes del uso.

25 2.2.2.3. Se añade etanol al 70%: 150 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) acuoso a 350 ml de etanol al 100% y se mezcla bien.

30 2.2.3. Preparación de ARN con el kit RNeasy 96

2.2.3.1. Las muestras congeladas se descongelan a temperatura ambiente durante 40 minutos. Al mismo tiempo, se descongela una columna de controles de extracción para cada placa (Controles de Extracción: los controles de extracción RNeasy son una serie de 8 tubos todos conectados entre sí. Dentro de cada tubo hay 170 μ l de lisado celular con una cierta relación entre células positivas y negativas para VHC. Desde la parte superior a la inferior hay dos de cada uno de los siguientes controles: bajo, medio, alto y cero, respectivamente. (Véase la sección 2.3 del protocolo mostrado más adelante)).

40 2.2.3.2. Las muestras se mezclan aspirando y liberando cinco veces con una pipeta 100 μ l. La muestra entera se transfiere a las columnas 1-10 del bloque de pocillos cuadrados de Matrix de 2 ml (programa I en P250: Mezcla 100 x 5, Relleno 170, Purga).

2.2.3.3. Se transfieren 150 μ l del patrón de replicación a la columna 11 (sin muestras en la columna 12).

45 2.2.3.4. Se añaden 150 μ l de etanol (EtOH) al 70% a cada muestra (programa 4 en P1250: Relleno 1250, Disp 150).

50 2.2.3.5. Una placa de RNeasy 96 marcada con el número de placa apropiado se pone en el colector de vacío. Se mezcla y se transfiere el lisado/EtOH a la placa RNeasy 96 (programa I en P1250: Mezcla 200, Tiempos 5, Relleno 330 y Purga). Todos los pocillos que no se hayan usado se cierran herméticamente con una cinta transparente (suministrada por Qiagen), normalmente en la columna 12.

2.2.3.6. Se aplica vacío (aproximadamente 800 mbar) para cargar la muestra en las mini-columnas.

55 2.2.3.7. La placa RNeasy-96 se lava con 1000 μ l de tampón RW1 (Qiagen)/pocillo (programa 2 en P1250: Relleno 1000, Disp 1000).

2.2.3.8. Se aplica vacío al filtro a través del tampón RW1 y se vacía el flujo.

60 2.2.3.9. La placa RNeasy-96 se lava con 1000 μ l de tampón RPE/pocillo (programa 2 en P1250).

2.2.3.10. Se aplica vacío para filtrar a través del tampón RPE.

2.2.3.11. Repetir la etapa 2.2.3.9

65 2.2.3.12. Se aplica vacío al filtro a través del tampón RPE, manteniendo el vacío aplicado durante 3 minutos.

ES 2 325 481 T3

2.2.3.13. Secar la placa RNeasy-96: la placa RNeasy-96 se pone en una rejilla de microtubos de recogida (suministrada por Qiagen), se cubre con la cinta AirPore suministrada y la unidad se centrifuga durante 10 min a 6000 x g (Centrífuga Qiagen Stigma; 4-15°C).

5 2.2.3.15. Eluir el ARN de la placa de 96 pocillos RNeasy: la placa RNeasy se transfiere a la parte superior de una nueva rejilla de microtubos de recogida. Se añaden 70 μ l de agua sin RNasa en la mitad de cada pocillo (programa 3 en P1250: Relleno 850, Disp 70).

2.2.3.16. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y después poner una cinta AirPore limpia sobre la placa.

10 2.2.3.17. La unidad después se centrifuga durante 4 minutos a 6000 x g en un centrífuga Stigma 4-15C. El volumen eluido mide entre 28 μ l y 50 μ l.

15 2.2.3.18. Se desecha la placa RNeasy-96 y la rejilla de tubos de recogida se cierra herméticamente con las tapas proporcionadas por Qiagen (8 por tira).

2.2.3.19. El ARN eluido se almacena a -80° C o se analiza inmediatamente en el ensayo TaqMan®.

20 2.3 Preparación de Controles de Extracción

Día 1

2.3.1.1. Cultivar 2,5 x 10⁷ células productoras de replicón en un matraz de cultivo de tejidos de 150 cm² (T-130).

25 3.3.1.3. Cultivar 2,0 x 10⁹ células Huh7 en un matraz de cultivo de tejidos de 75 cm² (T-75).

2.3.1.3 Incubar durante una noche a 37°C.

30 Día 2

2.3.1.4. Lisar las células con tampón de lisis.

35 2.3.1.5. Retirar el sobrenadante de las células Huh7 y las células productoras de replicón y lavar la monocapa con 10 ml de medio sin suero (MEM).

40 2.3.1.6. Añadir 30 ml de tampón de lisis (con 1 μ l de solución madre de BVDV/15 ml de tampón de lisis) a las células Huh7, mezclar pipeteando de forma repetida y poner el lisado celular en un tubo de centrífuga de cultivo de tejidos de fondo cónico de 50 ml.

2.3.1.7. Añadir 10,5 ml de tampón de lisis a las células productoras de replicón, mezclar pipeteando repetidamente y poner el lisado celular en un tubo de centrífuga de cultivo de tejidos de fondo cónico de 15 ml.

45 2.3.2. Para el patrón de extracción de HJGH: recoger alícuotas de 170 μ l de células productoras de replicón y lisarlas en las filas 5 y 6 de dos rejillas de tubos de 0,75 ml Matrix.

50 2.3.3. Para el patrón de extracción MEDIO: Añadir 1,0 ml del lisado de células productoras de replicón a 9 ml del lisado de Huh7 y mezclar bien. Añadir una alícuota de 170 μ l de esta mezcla a las filas 3 y 4 de dos rejillas de tubos de 0,75 ml Matrix.

2.3.4. Para el patrón de extracción BAJO: Añadir 50 μ l del lisado de células productoras de replicón a 10 ml del lisado de Huh7 y mezclar bien. Añadir alícuotas de 17,0 μ l de esta mezcla a las filas 1 y 2 de dos rejillas de tubos de 0,75 ml Matrix.

55 2.3.5. Control de extracción CERO: añadir alícuotas de 170 μ l del lisado de células Huh7 a las filas 7 y 8 de dos rejillas de tubo de 0,75 ml Matrix.

2.3.6. Almacenar los controles a -80°C.

60 3. RT-PCR TaqMan y Análisis de Datos

65 3.1 *Introducción*: Se usa RT-PCR cuantitativa a tiempo real para medir la cantidad de ARN de replicón de VHC en cada muestra. Esta tecnología también se denomina ensayo de nucleasa 5' basado en PCR y TaqMan®. El instrumento analítico es el Applied Biosystems 7700 Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este instrumento es esencialmente un espectrógrafo de fluorescencia inducido por láser multiplexado en tiempo acoplado con un aparato de ciclos térmicos. Controla la acumulación de amplicón de PCR en cada pocillo de una bandeja de muestras de 96 pocillos a lo largo del transcurso del procedimiento de PCR.

ES 2 325 481 T3

3.2. *Uso de control interno de BVDV*: Como se ha mencionado en la sección previa, en todas las muestras se incorpora un control positivo interno. Sirve como medida de la eficacia de la extracción del ARN y demuestra si la muestra contiene contaminantes que inhiban la PCR TaqMan®. BVDV se mezcla con el tampón de lisis celular caotrópico antes de aplicar el tampón de lisis a las células. Aunque en todas las muestras está el control positivo, el ensayo del control positivo interno de BVDV sólo se realiza cuando los datos del ensayo de ADN de replicón de VHC están fuera de los límites esperados, lo que sugiere que podría haber un problema con las muestras. El 7700 puede controlar simultáneamente la acumulación de dos amplicones de PCR diferentes en el mismo tubo usando sondas de detección marcadas con dos colorantes indicadores fluorescentes diferentes (“multiplexación”). Los criterios específicos que inducen un análisis TaqMan® para el control positivo interno de BVDV de una placa de muestras se describen en la sección de análisis de datos (3.6).

3.3 *ARN de replicón de VHC, sonda y cebadores de TaqMan®*. Debido a la estabilidad genética esperada y a la falta general de ARN, se emplean la estructura secundaria del gen de resistencia a neomicina (*neo*) codificado en el replicón, cebadores y una sonda que se une a esa región. Este segmento del ARN del replicón se extiende desde la base 342-1193 del replicón de 8001 pares de bases. (SEC ID N°: 1):

```

301 atncttgcga gtncccccgg aggtctcgtc gaccctgcac cctgagcccc aatccctaac
362 ctcaaaagaa aaccaaaatc tucnccatuy ggcctcctat gnttgaacaa ya'ypnatkyc
422 acgcaagatc tccggccctc tgggtcgaga ggcctatccg ctatgactgg gcacaacaga
481 caatcyyctg ctctggtgcc gccygtgtrc agctgctcgc scaggyyucy caggatcttc
541 ctgccaagac cagccctctc gytgccctga atgmuatgca gacccagaca gctcyyctac
601 cgtggtctgg caccgacggc gctccttgcg cagctgtctc ggaacttctc actcaacagg
662 yaaagggact gctyctactg ygcygaagtc gggggcagga tctcctgkta tccnccctkx
722 ctccctgccc aaagctacc atcatgctc agcaat'gcy gctgctcct acgctctgat
781 cggctaccct cccatctcac caccnagttg aacatcgcat gngy:gaqca cgtactgaga
841 tggaaagccg tcttgcctat cuggatgata rggacgaaqa gcactcgggg ctcgcyccag
901 caaaactgct ccccaagctc aagctcgcga tgcctcagcg cggagctctc gtcctgacct
961 atggcgatgc ctgcttgcgg atatctcagy taaacaactg cccgctttct ggaatcctcc
                                cebador directo
1021 actgtgcccg cctggcttct gaggaccctc atcaggncat agcgtctgct acccctgata
                                sonda TagMan
1081 ctgctgaaag ycttggccgc gaaatggcctg accgctctct ctatctctac gctatcgccg
                                cebador inverso
1141 ctcccgaatc gacagcctc gccctctatc gccctctctg cgggtctctc tgaqcttana
    
```

3.4. Procedimientos

3.4.1. Procedimiento para preparar mezclas maestras 1x para RT-PCR de NEO y BVDV

TABLA 6

Resumen de equipo y suministros para preparar mezclas maestras de 10 placas de RT-PCR

Equipo y suministros	N° de pedido	Proveedor
Pipeta de 0,5-10 µl	22 47 005-1 2000 Series	Eppendorf
Pipeta de 2-20 µl	22 47 005-9 2000 Series	Eppendorf
Pipeta de 10-100 µl	22 47 020-5 2000 Series	Eppendorf
Pipeta de 50-200 µl	22 47 025-6 2000 Series	Eppendorf
Pipeta de 100-1000 µl	22 47 230-2 2000 Series	Eppendorf
Puntas Matrix de 1250 µl	N° de catálogo 8255	Matrix
Puntas Matrix de 200 µl	N° de catálogo 7275	Matrix
Puntas ART de 10 µl	N° de catálogo 2140	Molecular Bioproducts
Puntas ART de 20 µl	N° de catálogo 2149 P	Molecular Bioproducts

ES 2 325 481 T3

5	Puntas ART de 100 µl	Nº de catálogo 2065 M	Molecular Bioproducts
	Puntas ART de 200 µl	Nº de catálogo 2069	Molecular Bioproducts
	Puntas ART de 1000 µl	Nº de catálogo 2079 E	Molecular Bioproducts
	Pipeta electrónica, Impact2	Nº de catálogo 2001	Matrix
10	Tubos de microcentrifuga sin RNasa de 1,5 ml	Nº de catálogo 12450	Anibion
15	Tubos de polipropileno de 14 ml	Nº de catálogo 352059	Falcon
	Depósito de reactivo de 25 ml	Nº de catálogo 8096	Matrix
20	Placa de reacción de 96 pocillos	Nº de catálogo N801-0560	Applied Biosystems
25	Tiras de protección óptica	Nº de catálogo N801-0935	Applied Biosystems
	Revestimientos estériles desechables	Nº de catálogo 9515-E	Baxter
30	<u>Reactivos</u>	Nº de pedido	Proveedor
	Ácido	HCl 0,1 N	Fisher
35	RNAse Zap	Nº de catálogo 9780	Ambion
	RNAse away	Nº de catálogo 7005	Molecular Bioproducts
40	10-pak, kit de reactivos nucleares EZ RT-PCR, tampón de reacción 5x, acetato de manganeso 25 mM, dcnxy NTPs	Nº de catálogo 403028	Applied Biosystems
45			
50	Sonda VIC NEO 2 µM, (=10x), 550 µl por alícuota	Nº de catálogo 450003, adaptado, 5'-VIC-CTG TGG CCGGCT OGG TGT GG-TAMRA-3'(SEC ID N°2)	Applied Biosystems
55			
60	Sonda VIC NEO 2 µM, (=10x), 550 µl por alícuota (Vertex)	Nº de catálogo 450003, adaptado, 5'-VIC-CCTCG TCC ACG TGG CAT CTC GA- TAMRA-	Applied Biosystems

65

ES 2 325 481 T3

		3'(SEC ID N° 3)	
5	Cebador directo de NEO 3 μM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 μl por alícuota	N° de catálogo 4301972, adaptado, 5'-CCG CCT TTC TGG ATT CAT CG- 3' (SEC ID N° 4)	Applied Biosystems
10	Cebador directo de NEO 3 μM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 350 μl por alícuota	N° de catálogo 430.1972, adaptado, 5'- CCC ATT CGCCGC CAA-3' (SEC ID N° 5)	Applied Biosystems
15	Cebador directo de BVDV 3 μM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 μl por alícuota	adaptado, 5-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-3' (SEC ID N° 6). Purificación en gel a escala 1,0 μM	Oligos, etc.
20	Cebador directo de BVDV 3 μM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 μl por alícuota	adaptado, 5' GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEC ID N° 7), en gel, escala de purificación 1,5 μM	Oligos, etc.
25	Patrones de ARN de NEO	ARN transcrito <i>in vitro</i> a partir de un plásmido que contiene la parte del gen <i>neo</i> de ARN del replicón de VHC usando ARN polimerasa de T7. El ARN transcrito <i>in vitro</i> se cuantifica basándose en un peso molecular conocido de los transcritos y la absorbancia UV de la solución de transcrito purificada. Este ARN se diluye, se reparte en alícuotas y se almacena a -80°C. Se descongelan alícuotas individuales para cada ensayo TaqMan®.	
30	Muestras de ARN a ensayar aisladas a partir de células de replicón de VHC (sección 2 de este protocolo), 10 μl/placa de 96 pocillos		
35	Agua sin nucleasa (no tratada DEPC)	N° de catálogo 9930	Ambion

65

ES 2 325 481 T3

3.4.2. Preparación de Reactivos para la Mezcla Maestra

3.4.2.1. Limpiar el banco de trabajo siguiendo las dos etapas indicadas a continuación y limpiar las pipetas con RNase away.

5 RNase Zap (Ambion. Austin. TX)

RNase Away (Molecular Bioproducts. San Diego, CA)

10 3.4.2.2. Abrir los reactivos nucleares de EZ RT-PCR (Applied Biosystems) y poner el tampón 5x en hielo, descongelar los reactivos congelados a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y después ponerlos en hielo. Un kit de reactivos EZ RT-PCR puede usarse para analizar dos extracciones de ARN de 96 pocillos.

15 3.4.2.3. Coger un tubo de sonda VIC 2 μM (NEO o BVDV, 550 μl por tubo) a -20°C y ponerlo en hielo.

3.4.2.4. Coger un tubo de mezcla de cebador directo/inverso 3 μM (NEO o BVDV, 550 μl por tubo) a -20°C y ponerlo en hielo.

20 3.4.2.5. Coger un tubo (30 μl) de transcrito de ARN patrón (10^8 copias/10 μl) a -80°C y ponerlo en hielo.

3.4.2.6. Coger un tubo de agua Ambion a temperatura ambiente.

25 3.4.3. Montaje de mezcla maestra para una reacción en placa 96 de pocillos

3.4.3.1. Usar una pipeta de 1 ml para transferir tampón 5x (Applied Biosystems) a un tubo de 14 ml; el volumen total añadido es 1100 μl .

30 3.4.3.2. Usar una pipeta de 1 ml para añadir $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ 25 mM (Applied Biosystems) a un tubo de 14 ml; el volumen total añadido es 660 μl .

3.4.3.3. Usar una pipeta de 200 μl para añadir 165 μl de dATP 10 mM al tubo de 14 ml. Hacer lo mismo para dCTP 10 mM, dUTP 20 mM y dGTP y 10 mM.

35 3.4.3.4. Usar una pipeta de 1 ml para añadir 550 μl de mezcla de cebador directo/inverso 10x3M.

3.4.3.5. Usar una pipeta de 1 ml para añadir 550 μl de sonda 10x2 μM .

40 3.4.3.6. Usar una pipeta de 1 ml para añadir 220 μl de ADN polimerasa de *rTth* (Applied Biosystems).

3.4.3.7. Usar una pipeta de 100 μl , para añadir 55 μl de AmpErase UNG (Applied Biosystems).

45 3.4.3.8. Usar una pipeta de 1 ml para añadir 605 μl de H_2O Ambion al tubo de 14 ml: el volumen final es de 4400 μl en total.

3.4.3.9. Transferir los 4400 μl de mezcla maestra a un depósito de reactivo de 25 ml.

3.4.3.10. Distribuir 40 μl por pocillo en los 96 pocillos usando una pipeta de 8 canales.

50 3.4.3.11. Transferir 10 μl de muestras desconocidas extraídas a pocillos de la placa de reacción usando una pipeta de 8 canales, columna por columna, de la columna 1 a la columna 11. Tapar cada columna después de la transferencia.

55 3.4.3.12. Añadir 270 μl de H_2O Ambion a los 30 μl de 10^8 copias/10 μl de transcrito de ARN para uso en la curva patrón y mezclar. Ahora hay 10^7 copias del ARN del patrón de cuantificación del replicón de VHC/10 μl .

3.4.4. Preparación del ABI 7700 para cada ensayo

60 3.4.4.1 Antes de cada ensayo, reiniciar el ordenador para el ABI 7700 y reconstruir el escritorio.

3.4.4.2 Cerrar y retirar cualquier programa redundante del disco duro, eliminar los datos sobrantes.

3.4.4.3 Abrir el programa Sequence Detector v1.7 (SDS software).

65 3.4.4.5 Abrir la carpeta "Replicon Assay Runs".

ES 2 325 481 T3

3.4.4.6 Abrir la placa de plantilla de “Ensayo de Replicón”. Las condiciones de los ciclos térmicos programadas en la plantilla son las siguientes:

Etapa I: 50°C durante 2 minutos.

Etapa 2: 60°C durante 30 minutos.

Etapa 3: 95°C durante 5 minutos.

Etapa 4: 95°C durante 15 segundos.

Etapa 5: 60°C durante 60 segundos.

Número de repetición de ciclos de las etapas: 4-5: 40.

Instrumento de plantilla: diagnóstico: opciones avanzadas:

Selección de vistas: mostrar mse.

Selección de vistas: mostrar el mejor ajuste.

Selección de misceláneo: colorante de referencia ROX.

3.4.4.7 “Grabar” (no “grabar como”) el archivo en la carpeta de “Ejecución de Ensayo de Replicón”.

3.4.4.8 Mostrar el setup: presionar EJECUTAR.

3.5 Preparar los datos ABI7700 después de una ejecución usando el software SDS

3.5.1. Las placas de ensayo se retiran del ABI7700 y se desechan sin haberse abierto. Esto reduce en gran medida los problemas de laboratorio con la contaminación cruzada de la PCR.

3.5.2. Los datos se analizan usando el software Sequence Detector System V1.7.

3.5.3. Los niveles umbral se establecen inicialmente usando parámetros por defecto.

3.5.4. Criterios de rechazo de datos: pueden rechazarse puntos de datos o series de placas enteras. Si ha habido una desviación significativa del protocolo, fallo del reactivo o contratiempos, o fallos en la ejecución del ABI 770, los datos deben descartarse. Para rechazar cualquier punto de datos de una ejecución aparentemente normal, deben cumplirse uno o más de estos criterios.

3.5.4.1. Cálculos del ciclo umbral. Normalmente usar los valores por defecto para el software SDS. Si el Ct de la muestra más concentrada es menor de 15, cambiar el límite de parada del valor umbral cuando sea necesario a un valor menor de forma que el Ct de la muestra de mayor concentración sea mayor que el valor de parada. Actualizar los cálculos después de hacer este cambio.

3.5.3.2. Considerar el rechazo de un ensayo TaqMan® anormal entero como se indica por una desviación de los valores medios para la pendiente y la intersección con el eje y de la línea generada por análisis de los patrones de ARN de neo. Los intervalos aceptables para estos valores son:

Los valores dependientes deben estar comprendidos entre 3,0 y 3,6

Los ciclos de intersección con el eje y deben estar comprendidos entre 36 y 41 ciclos.

3.5.4.3. Los pocillos TaqMan® individuales aberrantes indicados por $R_n/\Delta R_n$ extremos pueden suprimirse antes del análisis de los datos de forma que no afecten a los cálculos del software de SDS.

3.5.4.4. Examinar y registrar los valores de Ct de control sin plantilla y confirmar que son $>7,0 C_r$ ($> 100X$) mayores que el Ct para cualquier muestra tratada con compuesto.

3.5.5. Los valores de Ct de patrones de ARN de VHC se comparan con resultados previos.

3.5.6. La curva patrón de ARN de VHC se compara con resultados previos.

3.5.7. Si es evidente una amplificación aberrante en pocillos individuales, esos pocillos se identifican y se anotan.

3.5.8. El archivo de “resultados” se exporta y se transfiere desde el ordenador 7700 a otro ordenador para el análisis usando Microsoft Excel.

ES 2 325 481 T3

3.5.9. Se presenta cualquiera de los siguientes cambios en preparaciones de reactivos o diluciones usadas.

Síntesis de nueva sonda o cebador del vendedor.

Dilución y alícuotas de nueva sonda o cebador.

Preparación de nuevos transcritos de ARN de plantilla.

Dilución y alícuotas de transcritos de ARN de plantilla.

Nueva preparación viral de BVDV.

Nueva preparación de 11 patrones de columna.

3.6 *Análisis de datos TaqMan®*

3.6.1. Copiar y pasar el número de Ct de VHC de TaqMan® y el número de copias del archivo de resultados de TaqMan® a las celdas apropiadas del macro de Microsoft Excel del análisis de datos de Ensayo de Replicón, y ejecutar el macro.

3.6.2. Copiar la tabla de resultados TaqMan® de la hoja de macro en otra hoja, introducir el número de serie del compuesto y el número de lote.

3.6.3 A partir de esta hoja de Excel, se calcularán la media, desviación típica y CV en porcentaje de la actividad inhibidora del compuesto, así como el número de copias de VHC, el número de Ct de VHC y el número de Ct de BVDV (si está disponible) de todos los puntos de dilución en 5 réplicas y en un control sin compuesto.

3.6.4. Criterios para el rechazo de datos y realización de TaqMan® de control de BVDV. Comprobar todos los cálculos. Los puntos de datos o series de placas enteras pueden rechazarse. Si hay una desviación significativa del protocolo, fallo del reactivo o contratiempos, o fallo de la ejecución de ABI 7700, los datos deben desecharse. Para rechazar cualquier punto de datos de un ensayo aparentemente normal, deben satisfacerse uno o más de estos criterios. La desviación típica del porcentaje de inhibición debe ser menor del 30% en los compuestos activos. El % CV del número de copias de VHC debe ser menor del 30%. La desviación típica de Ct de VHC de todas las muestras debe ser menor de 0,5; esto es normalmente de aproximadamente 0,1 a 0,3 en la mayoría de las muestras. Si la desviación típica de Ct de VHC es mayor de 0,5, volver a la tabla de datos de partida y comprobar el número de Ct de 5 réplicas. Si el número de Ct de cualquier pocillo es 2 Ct diferente del número medio de Ct de 5 réplicas, entonces este pocillo debe omitirse del análisis. Si más de 3 pocillos (no en la misma columna) tienen números de Ct inusuales, entonces debe realizarse el ensayo de control interno del TaqMan® de BVDV. Si los datos de BVDV muestran irregularidad, entonces el compuesto debe ensayarse de nuevo.

3.6.5. Cálculo de CI_{50} : Copiar y pasar los datos de inhibición media y desviación típica a una dosis-respuesta sigmoidea con un calculador de pendientes variables que usa métodos de regresión no lineal. Usando esta herramienta, calcular el valor de CI_{50} usando los dos métodos: fijar el máximo a un 100% de inhibición únicamente o fijar el máximo a un 100% de inhibición y el mínimo a un 0% de inhibición. Después se presenta para cada compuesto el método que proporciona el ajuste más claro. El valor de CI_{50} más fiable procede del cálculo que tiene el menor error típico. Si los valores de CI_{50} calculados a partir de estas dos opciones de ajuste de curva muestran más de una diferencia de una vez, o si el CI_{50} de SD es mayor que el CI_{50} , el compuesto debe ensayarse de nuevo a las concentraciones ajustadas.

50 *Cálculo del Efecto de Inhibidores de Serina Proteasa de VHC en Combinación con Interferones*

El efecto de un inhibidor de serina proteasa de VHC (HSPI) y un interferón en combinación puede evaluarse en el Ensayo de Replicón generando una curva de dosis-respuesta para el HSPI en presencia de diversos niveles de interferón o determinando una curva de dosis respuesta para un interferón en presencia de varios niveles de HSPI. El objetivo es evaluar si hay más o menos inhibición de la acumulación de ARN viral de la que sería de esperar si los dos fármacos produjeran efectos aditivos en el ARN. Más específicamente, se usa la definición de aditividad de Lowe ((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic Ergebn. Physiol., 27, 47-187). Ésta se define como se indica a continuación. Supongamos que $D_{E,INF}$ es la concentración de interferón que produce un efecto E y supongamos que $D_{E,HSPI}$ es la concentración de inhibidor de proteasa que produce un efecto E.

Entonces no hay interacción o la aditividad de Lowe se define por la siguiente relación, donde la combinación de concentración D de U y D de HSPI produce el efecto E.

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSPI}} \quad (1)$$

ES 2 325 481 T3

Después, la falta de interacción o aditividad de Lowe se define por la siguiente relación, donde la combinación de concentración D_1 de INF y D_2 de HSPI produce el efecto E.

El grado de sinergia o antagonismo se expresa en términos de curvas de iso-efecto o Isoboles. La combinación (D1, D2) es un punto en un gráfico en el que los ejes son las concentraciones de interferón y HSPI (Fig. 2). Todas estas combinaciones que producen un nivel de efecto E forman el efecto E Isobol. Necesariamente $(D_{E,INF},0)$ y $(0,D_{E,HSPI})$ son puntos en el Isobol. Los Isoboles son líneas rectas que conectan puntos $(D_{E,INF},0)$ y $(0,D_{E,HSPI})$ cuando se satisface la relación de aditividad (1).

Los Isoboles cóncavos hacia arriba indican sinergia, y los Isoboles cóncavos hacia abajo indican antagonismo. Siguiendo las directrices de Berenbaum, M.C. ((1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.*, 114, 413-431), y Greco, Park and Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D Arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research*. 50, 5318-5327) se añade un término para (I) justificar la sinergia o el antagonismo. La ecuación define una superficie de respuesta que puede ajustarse a los valores de control en porcentaje a todas las combinaciones de tratamiento. Los gráficos del contorno de esta superficie de respuesta ajustada son los Isoboles.

El modelo de superficie de respuesta asume una respuesta a la dosis sigmoidea para cada compuesto definida por (2).

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{[Fármaco]}{IC50}\right)^m} + B \quad (2)$$

Las concentraciones que proporcionan un nivel de actividad E especificado solo se proporcionan por (3)

$$D_{E,INF} = IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m} \quad D_{E,HSPI} = IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m} \quad (3)$$

Para cumplir el modelo de Greco *et al.* (1990), la acción combinada de los fármacos debe satisfacer la ecuación (4) para cada combinación de fármacos que produce el nivel de respuesta E.

$$1 = \frac{\frac{[INF]}{IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m}} + \frac{[HSPI]}{IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m}}}{\alpha \frac{[INF][HSPI]}{IC50_{INF} IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{2/m}}} \quad (4)$$

El parámetro α mide la cantidad de interacción. Un valor cero de alfa significa que no hay interacción o aditividad ya que la ecuación se reduce a (I) cuando $\alpha=0$. Dados los valores de CI_{50} , las pendientes de Hill (m), el valor máximo (Emax) y el valor mínimo (B), esta ecuación puede solucionarse para proporcionar el efecto resultante de cualquier combinación de tratamiento [INF] y [HSPI]. Por lo tanto, esta ecuación define una superficie de respuesta. Dado un experimento en el que se varían [INF] y [HSPI], los parámetros pueden elegirse usando regresión de mínimos cuadrados ponderada no lineal. El parámetro α puede relacionarse con una medida de sinergia S (Hewlett, P. S. (1969) Measurement of potencies of drug mixtures, *Biometrics*, 25, 477-487) que se toma directamente a partir de los Isoboles a un efecto del 50%. S es la relación de la distancia desde el origen al Isobol que define la aditividad, a la distancia desde el origen al Isobol de los datos ajustados, a lo largo de la línea a 45 grados de los ejes. (S=ON/OM véase la Figura 3). La relación es $\alpha = 4 (S^2 - S)$.

El método descrito en Greco *et al.* (1990) anteriormente para ajustar la superficie de respuesta y determinar el parámetro de sinergia α con su nivel de significado se sigue para evaluar el grado de sinergia en una serie de experimentos ensayando HSPI en combinación con varios interferones diferentes. Sin embargo, existe la necesidad de ponderar observaciones con menos recuentos más que las que tienen mayores recuentos. Los recuentos se relacionan directamente con el porcentaje de control, que es el efecto E. Usando métodos descritos en Carroll, R.J. y Rupert, D. ((1988) Transformation and Weighting in Regression, Chapman and Hall, New York) puede verse que la variabilidad de un pocillo a otro aumenta con el cuadrado del porcentaje medio del valor de control. Por lo tanto, las observaciones se

ponderan por uno con respecto al cuadrado del valor de control en porcentaje (E) ajustado. La varianza y ponderación usadas para analizar estos experimentos es coherente con relaciones de variabilidad observadas por los investigadores que investigan métodos para el analizar ensayos de radioligando (Finney, D.J., (1976), Radioligand Assay, Biometrics, 32, 721-740, and Dudley, R. A. Edwards, P., Ekins, R. P. McKinzie, I. G. M., Raab, G.M., Rodbard. D. and Rodgers, R. P. C. (1985), Guidelines for Immunoassay Data Processing, Clinical Chemistry, 31/8. 1264-1271).

Resultados

En un experimento inicial, se ensaya el inhibidor de serina proteasa de VHC, Compuesto CU, en un intervalo de concentraciones de 3 μM a 0,0123 μM , es decir, un intervalo de 244 veces. Las concentraciones de interferón-alfa 2B varían de 30 unidades por muestra a 0,0096 unidades por muestra, es decir, un intervalo de 3125 veces. Como se muestra en la Tabla 7, cuando se usa como un solo tratamiento de fármaco, el Compuesto CU presenta un valor de CI_{50} de 0,48 μM y el interferón CI_{50} es 2,19 U. Dentro de la precisión del Ensayo de Replicón, que es de aproximadamente un 20%, la adición del interferón alfa 2B produce un aumento en la inhibición de la acumulación de ARN del replicón de una manera dependiente de la dosis. Por ejemplo, el tratamiento de las células con Compuesto CU 0,333 μM produce una inhibición del 28% de la acumulación de ARN del replicón. El tratamiento de las células con una combinación de Compuesto CU 0,333 μM , que es un 71% de la dosis de CI_{50} (0,469 μM) y 0,24 U de interferón alfa 2B, que es un 11% de la CI_{50} del interferón alfa 2B (2,05 μM) produce una inhibición del 49% de la acumulación de ARN del replicón. De esta manera, el 71% de una dosis CI_{50} en combinación con el 11% de la otra produce una inhibición del 49% de la acumulación de ARN del replicón. Usando una estrategia intuitiva para determinar si un tratamiento combinado es sinérgico o aditivo o antagonista, se podría predecir que si el efecto del tratamiento combinado fuera sólo aditivo, sería de esperar que las fracciones combinadas de las dos dosis de CI_{50} necesitaran obtener una inhibición del 49% de la acumulación del ARN del replicón para ser del 98%. Los resultados experimentales de los presentes solicitantes demuestran que el nivel de inhibición de la acumulación de ARN del replicón se consigue usando el 71% más el 11%, es decir, el 82% de la dosis de CI_{50} en lugar del 98%, como se predice para los efectos aditivos del tratamiento combinado. De esta manera, a estas concentraciones de compuestos, el efecto parece ser sinérgico porque se usan dosis fraccionales más pequeñas de la dosis de CI_{50} de cada compuesto para obtener una inhibición del 49% del ARN del replicón de VHC que la que se requeriría con cada compuesto solo, donde se necesitaría el 98% de las dosis CI_{50} . Los resultados de este tratamiento combinado se muestran en la Tabla 8 y gráficamente en la Figura 1.

TABLA 7

Inhibición de acumulación de ARN del replicón después de 48 horas de tratamiento con Compuesto CU e interferón alfa 2B, individualmente o en combinación							
Compuesto CU (conc.)	Interferón-alfa 2B (unidades)						
	30 U	6 U	1,2 U	0,24 U	0,048 U	0,0096 U	0 U
3 μM	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 μM	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0,333 μM	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0,111 μM	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,0370 μM	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,0123 μM	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 μM	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

Estos resultados iniciales, obtenidos como se ha indicado anteriormente por medio del uso del Ensayo de Replicón *in vitro* y un análisis de aditividad sencillo de los datos generados por ese ensayo, demuestran que el tratamiento combinado de células de replicón con un inhibidor de serina proteasa de VHC y un interferón produce al menos un efecto antiviral aditivo y probablemente un efecto antiviral sinérgico.

Los datos anteriores se han reanalizado usando las herramientas matemáticas formales descritas anteriormente para determinar si la relación entre el inhibidor de la serina proteasa de VHC CU y el interferón alfa-2B es sinérgica, aditiva o antagonista. Los datos reanalizados se muestran numéricamente en la Tabla 8 y gráficamente en la Figura 4.

ES 2 325 481 T3

La Tabla 8 resume resultados adicionales obtenidos en el Ensayo de Replicación después del tratamiento de las células que contienen replicación durante 48 horas con diversos inhibidores de serina proteasa de VHC de la presente invención y varios interferones diferentes, individualmente o en combinación. Se indica que la desviación típica de los valores medidos para la inhibición del ARN del replicón de VHC en el Ensayo de Replicación es del -20%. Los compuestos se ensayan en un amplio intervalo de concentraciones y a concentraciones de compuesto menores que no producen una inhibición significativa de la concentración de ARN del replicón de VHC. A causa de la desviación típica del ~ 20% del ensayo, algunos puntos de datos generarán números negativos. Los números de inhibición negativos indican en un experimento particular que hay en promedio más moléculas de ARN de replicón de VHC en las muestras tratadas con el compuesto que en las muestras tratadas de forma simulada.

TABLA 8

INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ARN DEL REPLICÓN DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE SERINA PROTEASA DE VHC Y DIFERENTES INTERFERONES, INDIVIDUALMENTE O EN COMBINACIÓN										
EXPERIMENTO 1										
IFN alfa-2B (unidades)										
		30,00	6,00	1,20	0,24	0,048	0,0096	0,000		
Compuest o CU (μM)	0,000	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%		
	0,012	92%	78%	44%	20%	19%	19%	6%		
	0,037	92%	78%	25%	21%	2%	7%	8%		
	0,111	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%		
	0,333	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%		
	1,000	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%		
	3,000	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%		
EXPERIMENTO 2										
IFN alfa-2A (unidades)										
		30	6	1,2	0,24	0,048	0,0096	0		
Compuest o CU (μM)	n	66%	61%	27%	1%	4%	5%	0%		
	0,0123	57%	66%	17%	22%	8%	8%	10%		
	0,37	83%	62%	13%	2%	60%	-10%	1%		
	0,1111	51%	68%	37%	20%	6%	12%	10%		
	0,233	92%	77%	38%	41%	26%	25%	11%		
	1	25%		36%	44%	31%	43%	85%		
	3	99%	99%	38%	98%	43%	48%	43%		
EXPERIMENTO 3										
Compuesto CU (μM)										
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
Interferón alfa-2B (unidades)	0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	2%	0
	0,049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%	3%
	0,123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%	2%
	0,307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	49%	-3%
	0,768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%	28%

ES 2 325 481 T3

	1,920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%	45%	
	4,8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%	59%	
5	12,0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	65%	80%	
	30,0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	92%	93%	89%	
	EXPERIMENTO 4										
	Compuesto CU (μM)										
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0	
10											
	0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%	0%	
15	0,0049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%	6%	
	Interferón	0,1234	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%	-8%
	Alfa-2A	0,307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%	10%
20	(unidades)	0,768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%	15%
	1,920	98%	96%	73%	48%	41%	44%	27%	33%	29%	
	4,8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%	43%	
25	12,0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%	73%	
	30,0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	84%	83%	
	EXPERIMENTO 5										
	Compuesto CU (μM)										
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0	
30											
	0,0	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0	
35	0,9375	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%	
	Orina	1,875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
40	Interferón	3,75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
	tau	7,5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
	(unidades)	15	98%	97%	84%	61%	59%	61%	56%	51%	53%
45	30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%	
	60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%	
	120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%	
	EXPERIMENTO 6										
	Comparación de Compuesto EC (μM)										
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0	
50											
	0	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0	
55	0,0492	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%	
	Interferón	0,1229	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
60	Alfa 2B	0,3072	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%

ES 2 325 481 T3

	(unidades)	0,768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
5		1,92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	94%	58%	47%
		4,8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
		12,0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
10		30,0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%
EXPERIMENTO 7											
Compuesto CU (µM)											
15			3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,023	0
										4	
		0	96%	92%	81%	47%	28%	17%	1%	-8%	0
		0,0492	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	10%	-17%
20	Interferón	0,1229	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	-22%
	Alfa 2A	0,3072	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
	(unidades)	0,768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
25		1,92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%
		4,8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
		12,0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
30		30,0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%
EXPERIMENTO 8											
Compuesto CU (µM)											
35			3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
		0,0	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
		0,2344	96%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	7%	1%
40	Interferón	0,4688	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
	Beta	0,9375	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%	30%
	(unidades)	1,875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
45		3,75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
		7,5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
		15,0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
50		30,0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%
EXPERIMENTO 9											
Comparación Comparativo EP (µM)											
55			8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0
		0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
60	Interferón	0,0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	3%	3%

65

ES 2 325 481 T3

	alfa-2B	0,1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
5	(unidades)	0,3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
		0,7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
		1,92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
10		4,8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%
		12	97%	98%	98%	97%	94%	89%	89%	87%	83%
		30	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%
15	EXPERIMENTO 10										
	Ribavirina (µM)										
			200	80	32	12,8	5,12	2,048	0,8192	0,3277	0
20		0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
	Interferón	0,0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
	alfa-2B	0,1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
25	(unidades)	0,3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
		0,7680	90%	30%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
		1,92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	16%
30		4,8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
		12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
		30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

35

Como se muestra en las Figuras 4-13, que representan gráficamente los datos de la Tabla 8 representados usando el método matemático descrito anteriormente para medir la sinergia, la curvas Isobol para todas las combinaciones de inhibidores de serina proteasa de VHC e interferones ensayadas son cóncavas hacia arriba, indicando que el efecto antiviral de los tratamientos en el Ensayo de Replicón es sinérgico. Estos resultados se presentan en la Tabla 9, que muestra los niveles relativos de sinergia para el tratamiento combinado y los valores de CI_{50} para los compuestos antivirales usados individualmente. Los elementos clave en la Tabla 9 son los valores α , y los valores p para las determinaciones. El término α es una medida de la inflexión máxima de las Isoboles para cada tratamiento combinado. Un valor α de cero indica aditividad, un valor negativo indica antagonismo y como ocurre en los tratamientos combinados con los inhibidores de serina proteasa de VHC y los interferones mostrados anteriormente, un valor mayor de uno indica sinergia. Cuanto mayor es el parámetro α , mayor es la sinergia. Como se muestra en la Tabla 9 para las combinaciones de inhibidores de serina proteasa de VHC e interferones, incluso ignorando los niveles de significado en cada experimento, un ensayo t basado en los 9 experimentos para el valor alfa medio de 0 (sin interacción) tiene un valor de p de 0,00014, indicando que los resultados son muy significativos.

50

El cálculo de sinergia basado en el método de Greco Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis Diaminedichloroplatinium and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327) usado en este análisis es una herramienta ideal para la evaluación del tipo de datos experimentales que pueden generarse usando el Ensayo de Replicón de VHC. Hay otros métodos que se aplican a estudios de compuestos antivirales tales como Pritchard y Shipman (Pritchard, M. N., y Shipman, C. Jr., (1990) "A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions (review)," Antiviral Res. 14: 181-206). La aplicación de su método de cálculo de sinergia a los datos mostrados en la Tabla 8 también indica el tratamiento combinado de las células de replicón con un inhibidor de serina proteasa de VHC e interferón que producen una inhibición sinérgica de la acumulación de ARN del replicón de VHC (datos no mostrados).

60

65

TABLA 9

NIVEL RELATIVO DE SINERGIA PARA EL TRATAMIENTO COMBINADO Y VALORES DE CI ₅₀ PARA COMPUESTOS ANTIVIRALES USADOS INDIVIDUALMENTE						
	Inhibidor de Serina Proteasa de VHC (HSPI)	Interferón	CI ₅₀ INF (unidades)	CI ₅₀ SPI (μM)	α (SE) ¹	P-amina α>0
Experimento 1	Compuesto CU	IFN alfa 2B	2,05	0,469	0,477(0,69)	<0,0001
Experimento 2	Compuesto CU	IFN alfa 2A	3,72	0,446	0,770(0,12)	<0,0001
Experimento 3	Compuesto CU	IFN alfa 2B	2,36	0,587	0,730(0,08)	<0,0001
Experimento comparativo 4	Compuesto CU	IFN alfa 2A	5,67	0,633	0,4,38(0,08)	<0,0001
Experimento 5	Compuesto CU	IFN tau	13,22	0,605	0,328(0,07)	<0,0001
Experimento comparativo 6	Compuesto EC	IFN alfa 2B	2,53	0,384	0,0516(0,10)	<0,0001
Experimento comparativo 7	Compuesto EC	IFN alfa 2A	5,50	0,312	1,24(0,20)	<0,0001
Experimento comparativo 8	Compuesto CU	IFN beta	1,82	0,466	0,551(0,09)	<0,0001
Experimento comparativo 9	Compuesto EP	IFN alfa 2B	3,06	0,426	0,4900(0,12)	<0,0001
Experimento 10	Ribavirina	IFN alfa 2B	1,22	145	0,24(0,067)	0,0004
¹ (SE) Error típico						

Otra medida para evaluar la naturaleza sinérgica del tratamiento con fármaco anti-VHC usando los presentes inhibidores de serina proteasa de VHC e interferones es usar los mismos métodos que se han descrito anteriormente para evaluar la terapia combinada convencional actual para el VHC, es decir, el interferón alfa-2B en combinación con Ribavirina en el Ensayo de Replicón. La última línea de la Tabla 9 demuestra que el parámetro α para una mezcla de interferón alfa-2B y Ribavirina es un número negativo, que indica que hay una pequeña cantidad de antagonismo entre estos dos fármacos. Esto subraya además el significado de los tratamientos combinados descritos en este documento que emplean los presentes inhibidores de serina proteasa de VHC en combinación con interferones, ya que estos tratamientos producen claramente sinergia, mientras que la terapia combinada convencional en uso para VHC (interferón alfa-2B en combinación con Ribavirina) no es sinérgica en el Ensayo de Replicón.

La comparación anterior de los tratamientos combinados que emplean los presentes inhibidores de serina proteasa de VHC más interferones frente a Ribavirina más interferón en el Ensayo de Replicón indica claramente que los primeros son sinérgicos, mientras que el último no lo es. Los resultados experimentales obtenidos usando el Ensayo de Replicón indican que sería eficaz una dosis mucho menor de interferón si el interferón se usara en combinación con un inhibidor de serina proteasa de VHC, en comparación con la dosis que se necesita cuando el interferón alfa-2B se usa en combinación con ribavirina. El Ensayo de Replicón es un sistema modelo útil en el que se ensayan posibles compuestos anti-VHC y actualmente se considera en sentido amplio un agente de predicción eficaz de actividad anti-VHC. Véase, por ejemplo, Blight *et al.* (2000) Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* 8; 290:1972-1974, and Chung *et al.* (2001) Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9847-52. La ribavirina sola es marginalmente eficaz para reducir la acumulación de ARN de replicón de VHC en el Ensayo de Replicón (Tabla 8, Experimento 10 y última línea de la Tabla 9). Este resultado está en aparente conflicto con los estudios *in vivo* en los que, cuando se usa por sí misma, la ribavirina no tiene ningún valor terapéutico significativo para el tratamiento de VHC. Por el contrario, en el ensayo de replicón, con corrección en relación con la citotoxicidad como se describe más adelante, la ribavirina tiene un valor de CI_{50} de $145 \mu M$. Este resultado puede explicarse reconociendo que el Ensayo de Replicón permite la evaluación de altas concentraciones de Ribavirina que no serían posibles en terapia humana debido a la citotoxicidad *in vivo* (Chutaputti A. (2000) Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 Suppl:E156-63).

Esta evaluación necesariamente requiere la determinación de la citotoxicidad de la ribavirina. Esta toxicidad se produce en pacientes y en ensayos celulares (Shiffman M. L., Verbeke S. B., Kimball P. M. (2000) Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes. *Antiviral Research*. -18(2):91-9). En los experimentos descritos en este documento, la citotoxicidad de la ribavirina en el Ensayo de Replicón se observa y se mide de dos formas. Tanto en el ensayo metabólico de XTT para determinar la viabilidad de las células con replicón (Roehm NW., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasbrook A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunol Methods*. 142(2):237-65) como en el ensayo de RT-PCR cuantitativo TaqMan[®] que mide los niveles de ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en células tratadas frente a no tratadas en el Ensayo de Replicón (Brink N. Szamel M., Young A.R., Wittern K.P., Bergemann J. (2000) Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. *Inflammation Research*, 49(6):290-6), se observa una citotoxicidad significativa inducida por ribavirina, pero se corrige como se indica a continuación. Se supone que el nivel de ARNm de GAPDH, que es un gen de mantenimiento (constitutivo) expresado constitutivamente, es igual en todas las células viables. Se sabe por medidas de los niveles de ARNm de GAPDH en células tratadas con el inhibidor de la transcripción actinomicina D que la semivida del ARNm de GAPDH es tan sólo de unas pocas horas (datos no mostrados). De esta manera, se postula, como se hace por otros usando la tecnología TaqMan[®] para determinar los niveles de ARNm particulares en células humanas, que los niveles de ARNm de GAPDH son proporcionales a los números de células viables (VCN) en cualquier muestra dada, con la relación de $VCN = 2^{(40 - Ct_{CAPDHmRNA})}$. El VCN se calcula para cada uno de los pocillos de muestra del Ensayo de Replicón y después se divide el número de copias de ARN de replicón de VHC para un pocillo específico por el VCN para ese pocillo. Una vez calculada, esta relación se usa en lugar del número de copias de VHC para calcular la inhibición ("Inhibición media usando relación": Fig. 14A). Sin corregir los datos del Ensayo de Replicón para esta citotoxicidad, dicha citotoxicidad se lee como una inhibición falsa positiva de la acumulación del replicón de ARN de VHC. En el Ensayo de Replicón, se supone que la inhibición medida de la acumulación del replicón de ARN de VHC es la suma de la inhibición real de la acumulación del replicón de ARN de VHC y la inhibición aparente de la acumulación del replicón de ARN de VHC debido a citotoxicidad. Además, se supone que, basándose en la correlación de las mediciones de ARNm de GAPDH TaqMan[®] y XTT como medidas de citotoxicidad, la inhibición de la acumulación del ARNm de GAPDH causada por compuestos ensayados en el Ensayo de Replicón es una medida fiable de la inhibición aparente de la acumulación del replicón de ARN de VHC debido a la citotoxicidad. De esta manera, la verdadera actividad anti-VHC de un compuesto en el Ensayo de Replicón corregida con respecto a la citotoxicidad general puede estimarse dividiendo el número de moléculas de ARN de replicón de VHC medidas en cada muestra por el VCN, normalizándose de esta manera con respecto al número de células viables en cada muestra. Usando este método, la Fig. 14A muestra una estimación de la verdadera actividad anti-VHC de ribavirina en el Ensayo de Replicón ("Inhibición media usando la relación"). La estimación de la CI_{50} para la Ribavirina se calcula mejor usando este método. En la Fig. 14A, la "Inhibición media original" muestra el valor de CI_{50} no corregido para la Ribavirina, que es aproximadamente $80 \mu M$, mientras que el valor de CI_{50} calculado corregido a partir de la curva de "Inh. Media. usando la relación" es aproximadamente $145 \mu M$. Obsérvese que la diferencia entre la inhibición corregida y medida de la acumulación del replicón de ARN de VHC como resultado del tratamiento con interferón alfa-2B (Fig. 14B) es insignificante en vista del % CV de ~20% del Ensayo de Replicón. Al igual que el interferón alfa-2B, los inhibidores de serina proteasa de

VHC ensayados en el presente ejemplo no muestran una citotoxicidad significativa a las concentraciones empleadas. Esto se determina usando ensayos XTT, en los que los valores de TC_{50} para los diversos compuestos son: CU = 64,7 μ M, EP > 10 μ M y EC > 50 μ M. Estos valores de TC_{50} son de 20-140 veces mayores que los valores de CI_{50} mostrados en la Tabla 9. De esta manera, la citotoxicidad de estos compuestos no tiene un efecto significativo sobre la acumulación de ARN de VHC en el Ensayo de Replicación dentro de la precisión del ensayo porque dicha citotoxicidad se produce únicamente a las concentraciones de inhibidor de serina proteasa de VHC significativamente mayores que las ensayadas en el Ensayo de Replicación.

10 Conclusiones en Relación con la Eficacia de Inhibidores de Serina Proteasa de VHC e Interferones, Individualmente y en Combinación

Las actividades anti-VHC de los presentes inhibidores de serina proteasa de VHC y diversos interferones cuando se usan solos en el Ensayo de Replicación de VHC se muestran en las columnas y líneas de los experimentos individuales que constituyen la Tabla 8 que emplea sólo el agente antiviral. La Tabla 9 indica los valores de CI_{50} medidos para cada compuesto antiviral cuando se ensaya solo. Los resultados anteriores, obtenidos por el uso del Ensayo de Replicación *in vitro*, también demuestran que el tratamiento combinado de las células de replicación con los inhibidores de serina proteasa de VHC de la presente invención y diversos interferones produce efectos antivirales sinérgicos. Es de esperar que estos efectos se traduzcan en una eficacia *in vivo*.

La terapia combinada que emplea inhibidores de serina proteasa de VHC de la presente invención posee varias ventajas importantes con respecto a la terapia con un solo fármaco. En primer lugar, haciendo posible el tratamiento con dosis menores de los fármacos individuales que las que se emplearían si se usaran solos, sería de esperar una reducción en toxicidad y efectos secundarios asociados con el tratamiento. Esto es especialmente importante en el caso de la terapia con interferón, donde los efectos secundarios son severos, y se ha demostrado que son proporcionales a la dosis administrada a los pacientes. Los datos anteriores indican que una dosis de inhibidor de serina proteasa de VHC tal como CU a un nivel de CI_{95} podía combinarse con una dosis de interferón alfa, por ejemplo, al nivel de CI_{50} , y el resultado sería una terapia mucho más eficaz que la que podría conseguirse con el inhibidor de serina proteasa de VHC solo sin los efectos adversos producidos por altas dosis de interferón alfa. Un segundo efecto beneficioso importante de la terapia combinada es que, como los dos fármacos actúan independientemente, existe menos probabilidad de desarrollo de cepas mutantes de VHC que resistan al tratamiento. El desarrollo de resistencia es una preocupación importante con los virus de ARN tales como VHC. Debido a su alta tasa de mutación, estos virus pueden adaptarse fácilmente a condiciones de estrés ambiental. Un tercer efecto beneficioso de la terapia combinada puede ser el coste reducido, debido a la necesidad de menores cantidades de agentes terapéuticos para conseguir un tratamiento eficaz.

Otros inmunomoduladores que pueden emplearse en los métodos descritos en la presente invención incluyen, por ejemplo, el interferón alfa 2A, interferón consenso, interferón tau, interferón + Ribavirina (Rebatron), interferón pegilado y promotores de la expresión de genes de interferón. Se prevé adicionalmente que la actividad anti-VHC de estos compuestos se mejorará cuando se usen en combinación con inhibidores de serina proteasa de VHC tales como los descritos en este documento. Como se sabe que los interferones son activos *in vivo* y en el Ensayo de Replicación, es de esperar que los presentes inhibidores de serina proteasa de VHC también sean activos *in vivo*, y lo que es más importante, sean capaces de inducir actividad sinérgica cuando se usan en combinación con interferones, estimuladores del sistema inmune de los mismos u otros compuestos que tengan actividad antiviral contra VHC que actúan por un mecanismo distinto de la inhibición de la serina proteasa de VHC.

La mejor terapia actual para VHC emplea interferón alfa y el análogo de nucleósido Ribavirina. Este tratamiento sólo es marginalmente eficaz y produce efectos secundarios significativos que reducen el seguimiento de la terapia por parte de los pacientes (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Además, en pacientes con trasplantes, no está claro si funcionan las combinaciones de ribavirina-interferón y, de hecho, pueden ser peores que el interferón solo (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999).

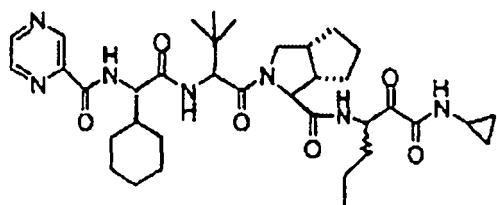
Los resultados presentados anteriormente demuestran un efecto combinado sinérgico cuando se usan interferones con una nueva clase de antivirales contra VHC, los inhibidores de serina proteasa de la presente invención. Es de esperar que los resultados *in vitro* descritos en este documento conduzcan a un tratamiento más eficaz de los pacientes con VHC que el que se puede conseguir actualmente usando el interferón solo. Las dosis subterapéuticas del interferón podrían movilizar el sistema inmune del paciente para luchar mejor contra el virus, y el inhibidor de serina proteasa podría atacar al virus directamente, proporcionando al virus un ataque a dos bandas por mecanismos de acción diferentes. De esta forma, se podría conseguir un tratamiento de la infección por VHC a un coste reducido para el paciente en términos de la disminución de efectos secundarios y menores pagos por agentes farmacéuticos necesarios, ya que se necesitan menos cantidades de los dos fármacos para conseguir una terapia antiviral eficaz contra el VHC.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto

5

10



BW,

15

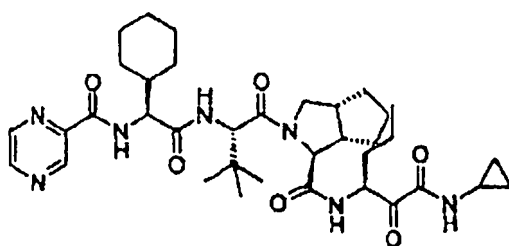
o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, o un solvato de dicho compuesto, su sal o su profármaco.

2. Un compuesto

20

25

30



CU,

35

o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, o un solvato de dicho compuesto, su sal o su profármaco.

3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40

4. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende además un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

50

6. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

55

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que dicho compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, dicho interferón y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C está cada uno presente en una cantidad seleccionada entre el grupo constituido por una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz y una combinación de las mismas.

60

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicho interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón limblastoide e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T helper de tipo I, ARN bicatenario, ARN bicatenario en combinación con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

65

9. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2 en la fabricación de un medicamento para inhibir la proteasa de HCV.

10. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2 en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección.

11. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2 junto con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de otro agente terapéutico anti-HCV, en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección.

5 12. El uso de la reivindicación 11 en el que el agente terapéutico anti-HCV es interferón o un interferón derivatizado.

13. Uso del compuesto de la reivindicación 1 ó 2 en combinación con un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesita.

14. Uso del compuesto de la reivindicación 1 a 2 en combinación con un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesita, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

15 15. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2 junto con un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C y un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesita, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

20 16. El uso de la reivindicación 15, en la que dicho compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, dicho interferón y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C está cada uno presente en una cantidad seleccionada entre el grupo constituido por una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz y una combinación de las mismas.

25 17. El uso de la reivindicación 16, donde dicho interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón limboblastoide e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T helper de tipo I, ARN bicatenario, ARN bicatenario complejo con bramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.

30 18. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2 y un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la preparación de un medicamento para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en una célula.

35 19. El uso de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente poner en contacto dicha célula con un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

40 20. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 ó 2, y un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón, en la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en una célula.

45 21. El uso de la reivindicación 19, en la que dicho inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C, dicho interferón y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C está cada uno presente en una cantidad seleccionada entre el grupo constituido por una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz y una combinación de las mismas.

50 22. El uso de la reivindicación 21, en la que dicho interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón limboblastoide e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T helper de tipo I, ARN bicatenario, ARN bicatenario complejo con bramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

55 23. Un kit o paquete farmacéutico que comprende una pluralidad de recipientes separados, en la que al menos uno de dichos recipientes contiene un inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C de la reivindicación 1 ó 2 y al menos otro de dichos recipientes contiene un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C.

60 24. Un kit o paquete farmacéutico que comprende una pluralidad de recipientes separados, en la que al menos uno de dichos recipientes contiene un inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C de la reivindicación 1 ó 2 y al menos otro de dichos recipientes contiene un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

65 25. Un kit o paquete farmacéutico que comprende una pluralidad de recipientes separados, en la que al menos uno de dichos recipientes contiene un inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C de la reivindicación 1 ó 2, al menos otro de dichos recipientes contiene un interferón que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, y al menos otro de dichos recipientes contiene un compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es distinto de un interferón.

ES 2 325 481 T3

26. El kit o paquete farmacéutico de la reivindicación 25, en el que dicho inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C, dicho interferón y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C está cada uno presente en una cantidad seleccionada entre el grupo constituido por una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz y una combinación de las mismas.

5

27. El kit o paquete farmacéutico de la reivindicación 26 en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo constituido por interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón limboblastoide e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad anti-virus de la hepatitis C se selecciona entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T helper de tipo I, ARN bicatenario, ARN bicatenario complejado con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Tratamiento de combinación con Interferón alfa-2B y Compuesto CU

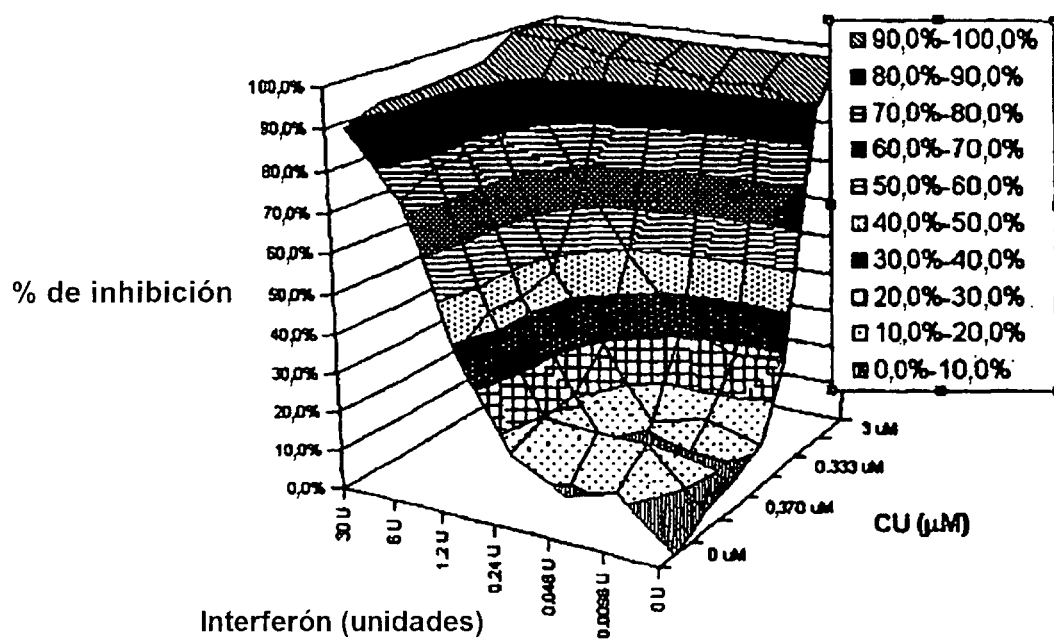


Fig. 2

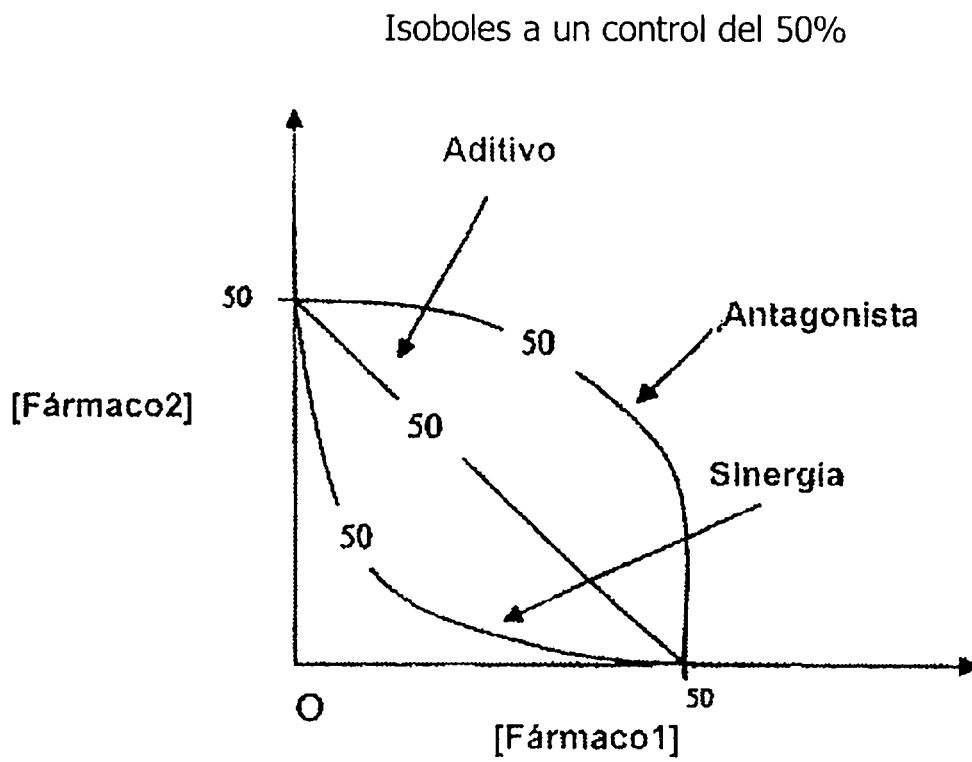


Fig. 3

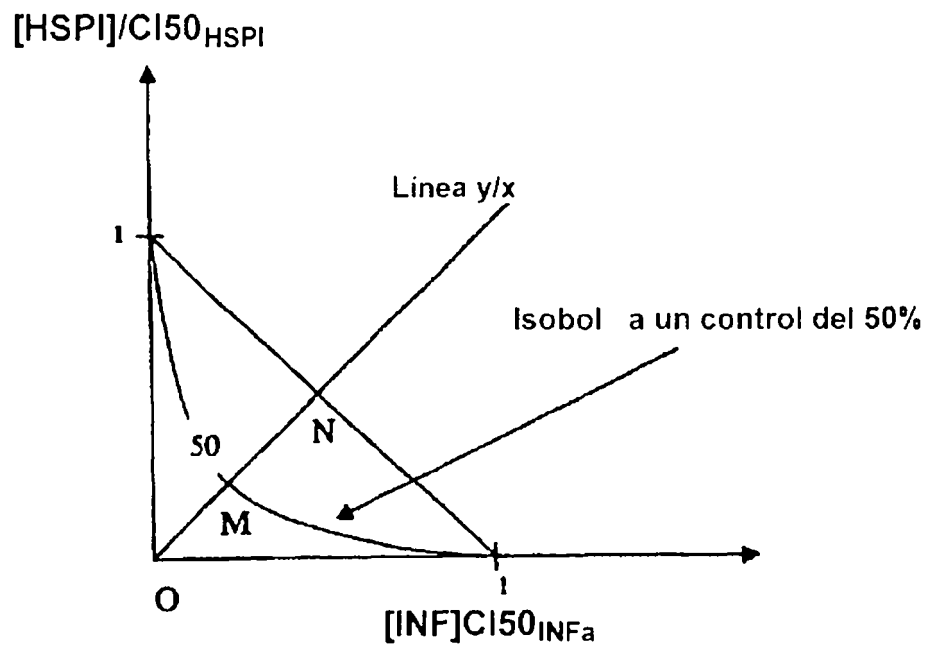


Fig. 4.

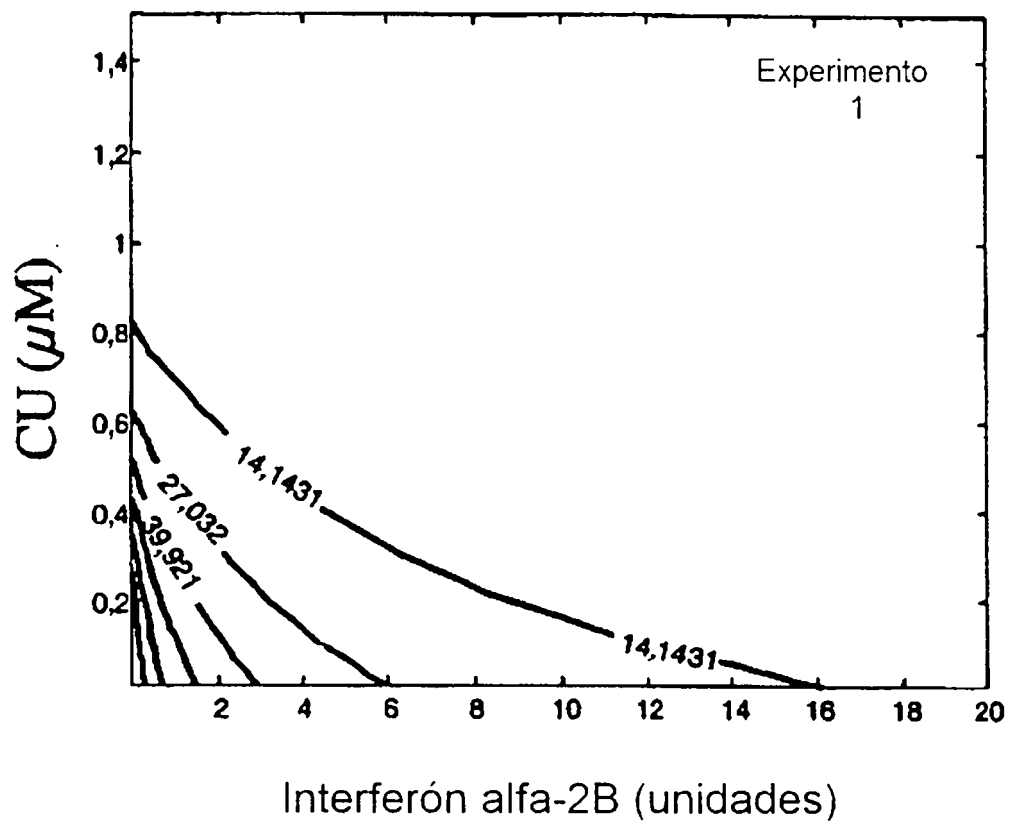


Fig. 5

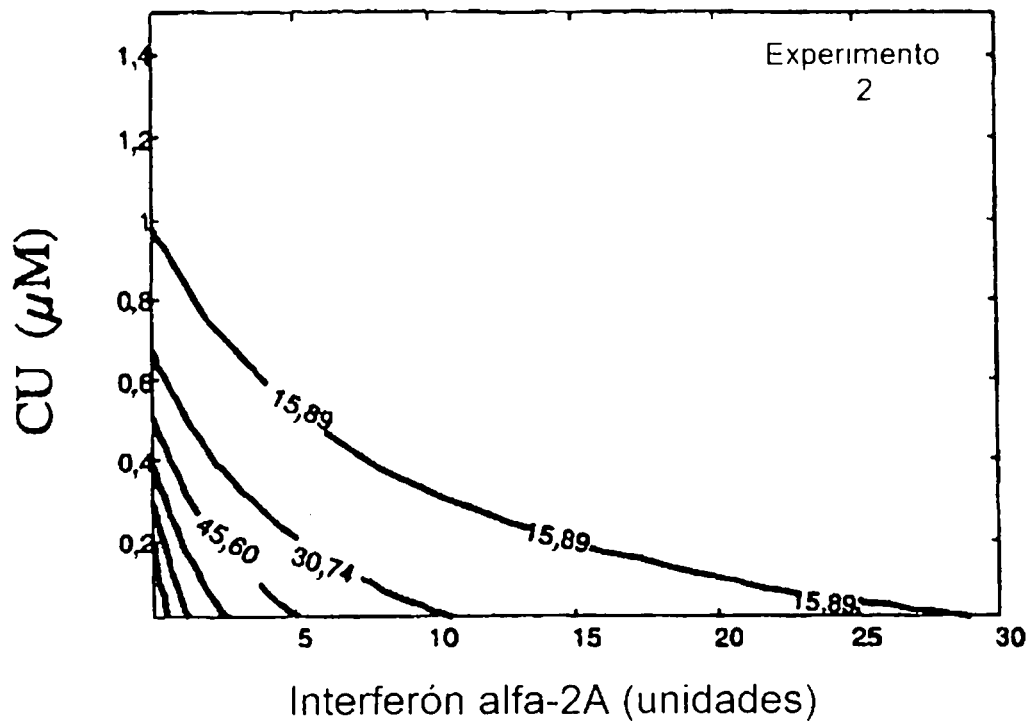


Fig. 6

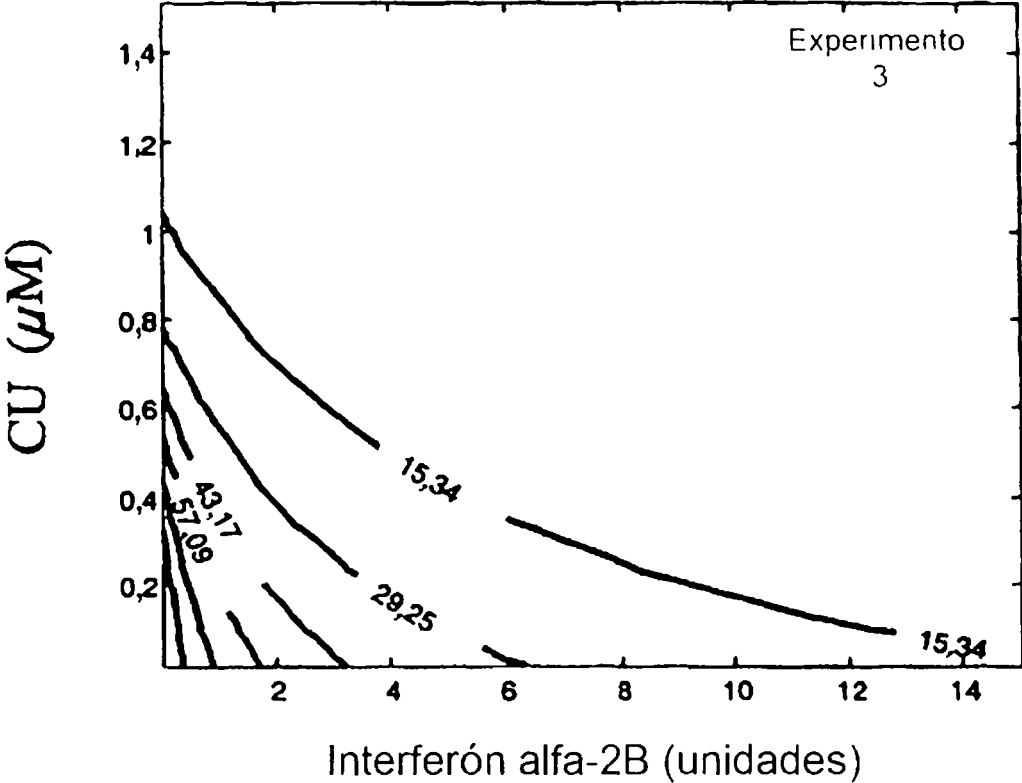


Fig. 7

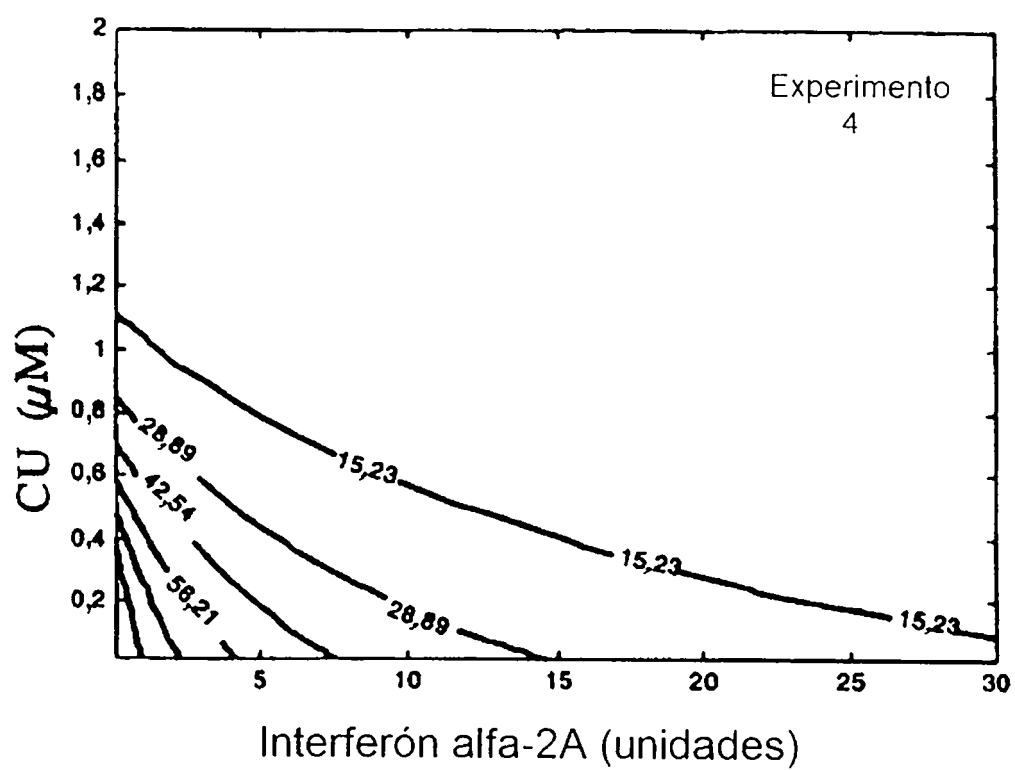


Fig. 8.

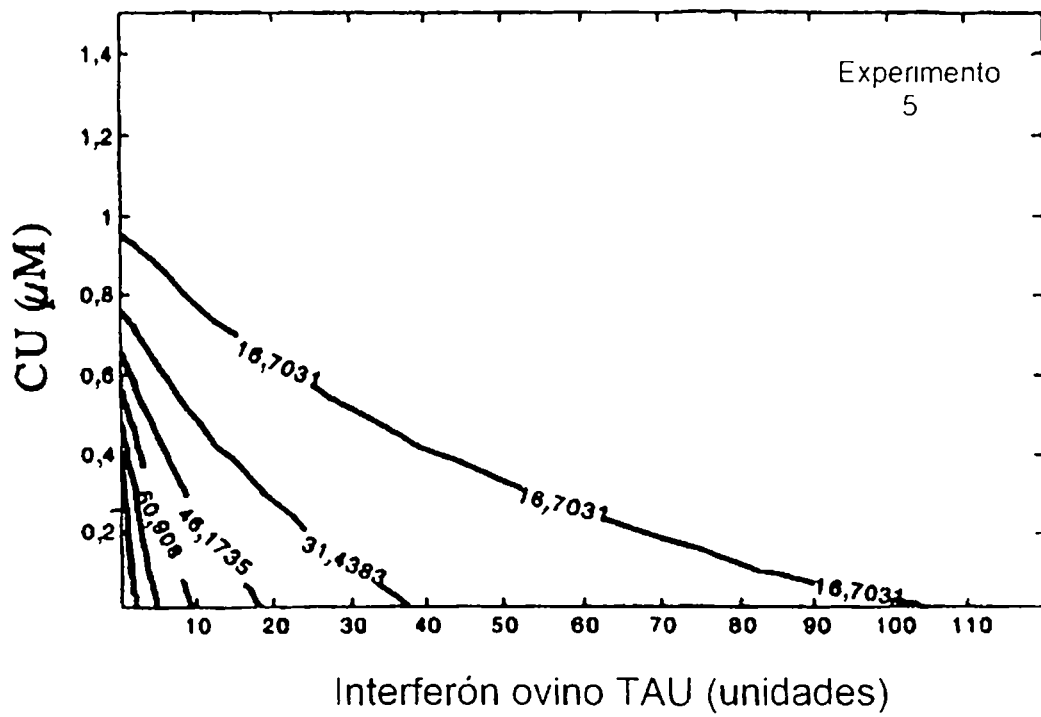


Fig 9.

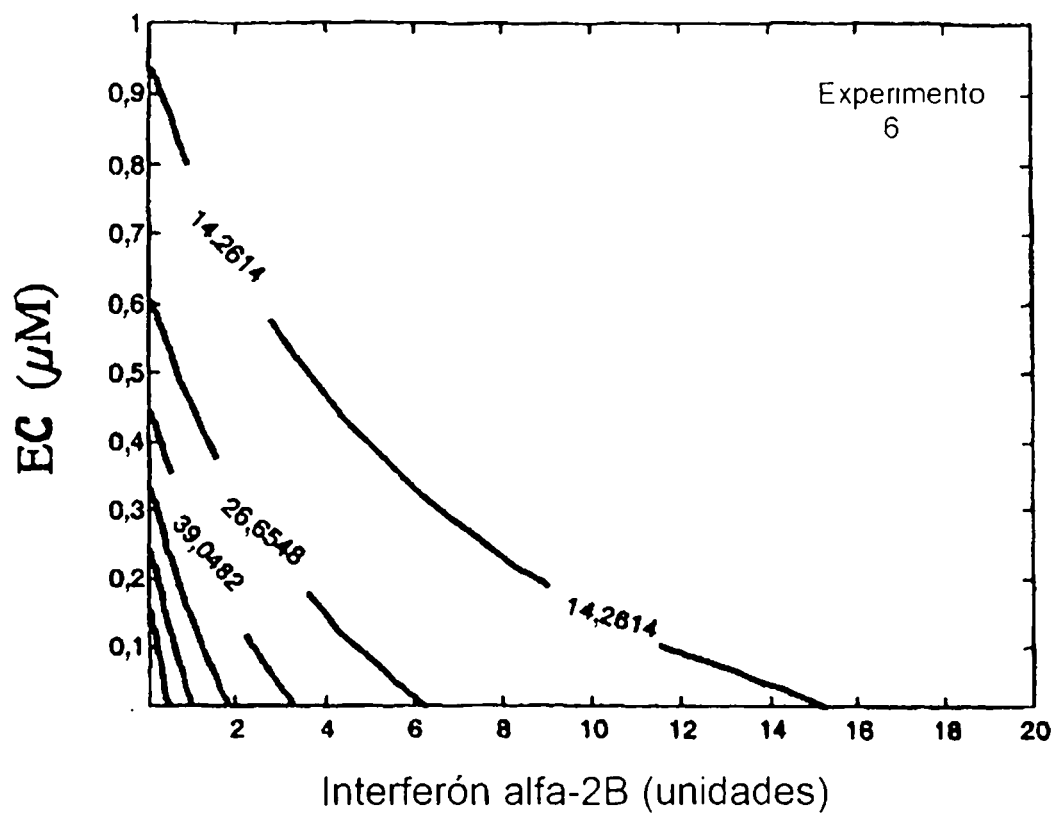


Fig. 10.

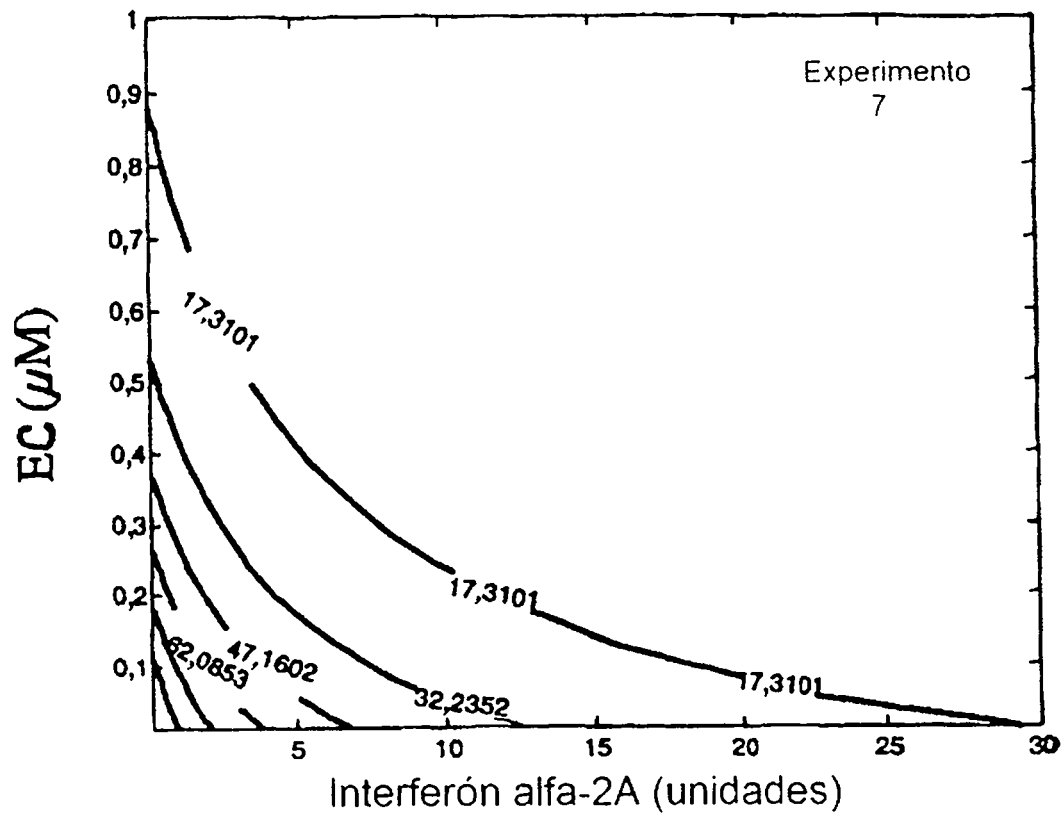


Fig 11.

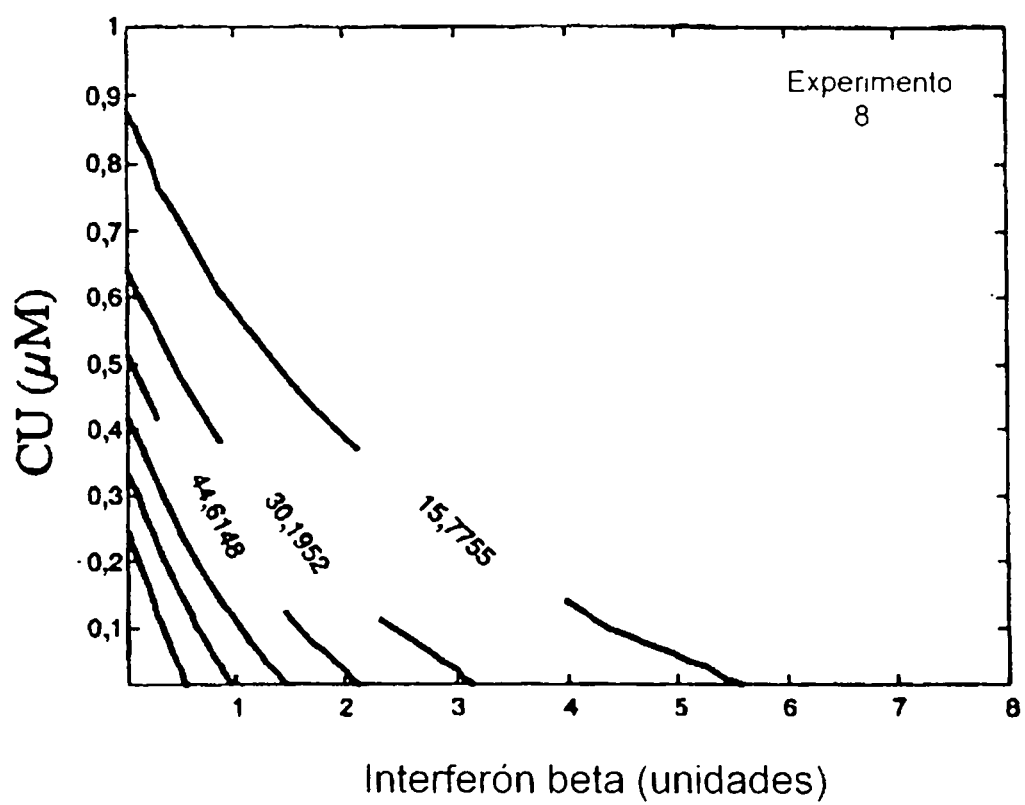
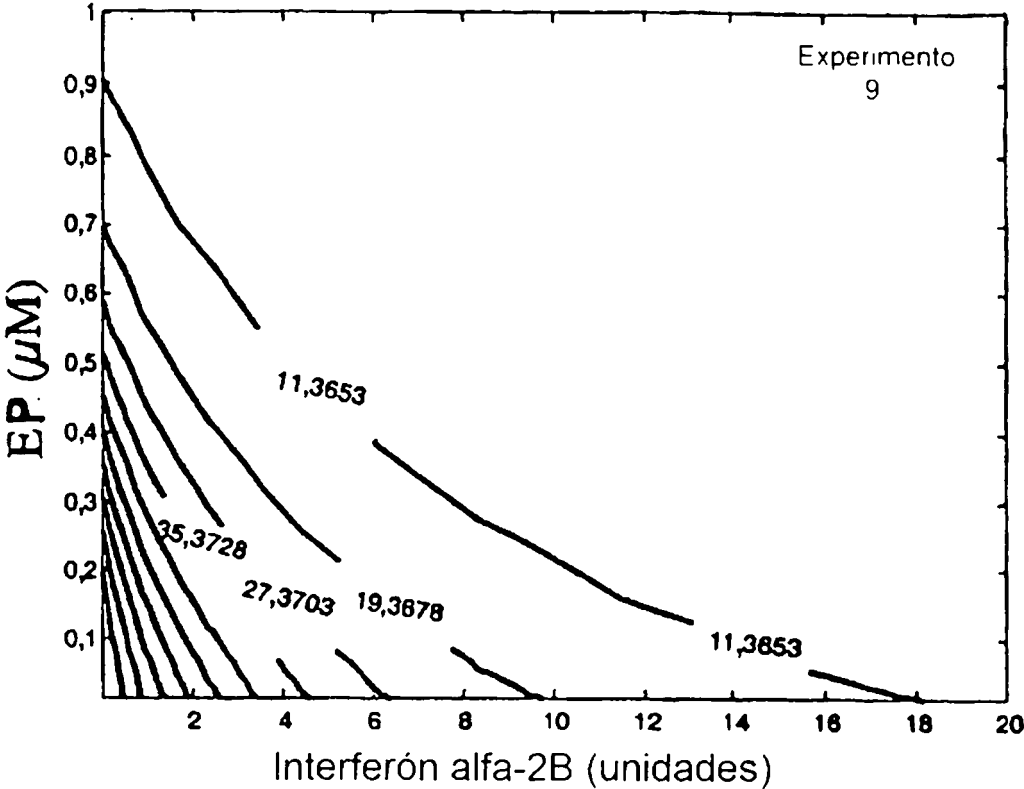


Fig. 12



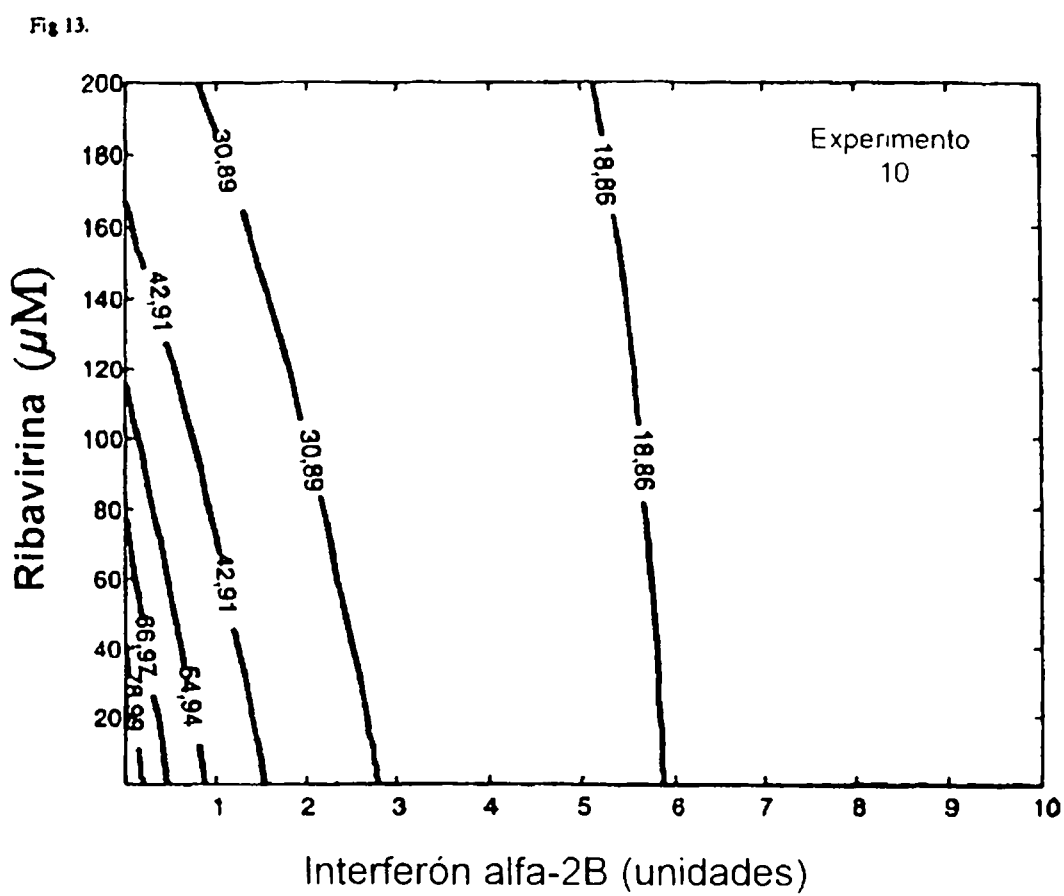
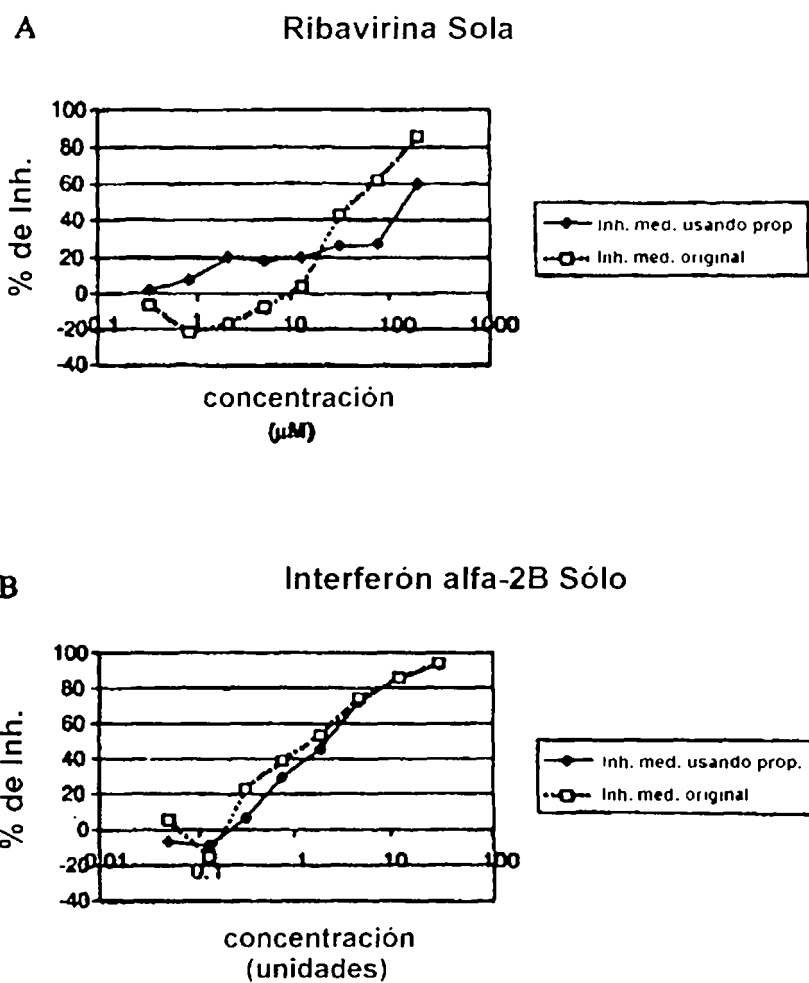


Fig. 14



ES 2 325 481 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vertex Pharmaceuticals Incorporation

5 <120> INHIBIDORES DE PROTEASA PEPTIDOMIMÉTICOS

<130> EP 01968040.4

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 900

<212> ADN

15 <213> virus de la Hepatitis C

<400> 1

```
20      gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcacg aatcctaac      60
      ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc      120
      acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga      180
25      caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcgc ccggttcttt      240
      ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat      300
      cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg      360
      gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg      420
30      ctctgccga gaaagratcc atcatggctg atgcaatgca gcggctgcat acgcttgatc      480
      cggctacctg ccattcgcac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcggg      540
      tgggaagccg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag      600
35      ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct      660
      atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg      720
      actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata      780
40      ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcggcg      840
      ctcccgatcc gcagcgcata gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaa      900
```

<210> 2

45 <211> 28

<212> ADN

<213> ser humano

50 <220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

55 <223> a representa inosina

<400> 2

60 vacctgtggc cggctgggtg tggtamra 28

<210> 3

65 <211> 31

<212> ADN

<213> ser humano

ES 2 325 481 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
5 <223> a representa inosina

<400> 3

10 vaccctcgt ccacgtggca tctcgatamr a 31

<210> 4
15 <211> 20
<212> ADN
<213> ser humano

20 <400> 4

 ccgcttttct ggattcatcg 20

25 <210> 5
<211> 15
<212> ADN
30 <213> ser humano

<400> 5

35 cccattcgcc gccaa 15

<210> 6
40 <211> 22
<212> ADN
<213> ser humano

45 <400> 6

 caggtagtc gtcagtggtt cg 22

50 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
55 <213> ser humano

<400> 7

60 ggcctctgca gcaccctatc 20

65