



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 417**

51 Int. Cl.:

C07K 5/078 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06764263 .7**

96 Fecha de presentación : **28.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1913014**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Inhibidores macrocíclicos del virus de la hepatitis C.**

30 Prioridad: **29.07.2005 EP 05107066**
03.02.2006 EP 06101278

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **TIBOTEC PHARMACEUTICALS**
Eastgate Village Eastgate Little Island
CO Cork, IE
MEDIVIR AB.

72 Inventor/es: **De Kock, Herman, Augustinus;**
Raboisson, Pierre, Jean-Marie, Bernard;
Simmen, Kenneth, Alan;
Lindström, Mats Stefan;
Kahnberg, Pia Cecilia;
Antonov, Dmitry;
Nilsson, Karl Magnus;
Samuelsson, Bengt Bertil y
Rosenquist, Åsa Annica, Kristina

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 360 417 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores macrocíclicos del virus de la hepatitis C

5 La presente invención se refiere a compuestos macrocíclicos que tienen actividad inhibidora sobre la replicación del virus de la hepatitis C (HCV). La misma concierne adicionalmente a composiciones que comprenden estos compuestos como ingredientes activos así como procesos para la preparación de estos compuestos y composiciones.

10 El virus de la hepatitis C es la causa principal de enfermedad hepática crónica en todo el mundo y se ha convertido en un foco de investigación médica considerable. El HCV es un miembro de la familia de virus *Flaviviridae* en el género *hepacivirus*, y está estrechamente relacionado con el género *flavivirus*, que incluye cierto número de virus implicados en enfermedades humanas, tales como el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, y con la familia de *pestivirus* animales, que incluye el virus de la diarrea viral de los bovinos (BVDV). HCV es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo, con un genoma de alrededor de 9.600 bases. El genoma comprende regiones no traducidas 5' y 3' que adoptan estructuras de RNA secundarias, y un marco de lectura abierta central que codifica una sola poliproteína de alrededor de 3010-3030 aminoácidos. La poliproteína codifica 10 productos génicos que se generan a partir de la poliproteína precursora por una serie orquestada de escisiones endoproteolíticas co- y post-traduccionales mediadas por proteasas tanto del hospedador como virales. Las proteínas estructurales virales incluyen la proteína de la nucleocápsida central, y dos glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura. Las proteínas no estructurales (NS) codifican ciertas funciones enzimáticas virales esenciales (helicasa, polimerasa, proteasa), así como proteínas de función desconocida. La replicación del genoma viral está mediada por una RNA-polimerasa dependiente de RNA, codificada por una proteína no estructural 5b (NS5B). Además de la función de polimerasa, se ha demostrado que las funciones de la helicasa y proteasa virales, codificadas ambas en la proteína NS3 bifuncional, son esenciales para la replicación del RNA de HCV. Además de la serina-proteasa NS3, HCV codifica también una metaloproteína en la región NS2.

20 Después de la infección aguda inicial, una mayoría de individuos infectados desarrollan hepatitis crónica dado que el HCV se replica preferentemente en los hepatocitos pero no es directamente citopático. En particular, la falta de una respuesta enérgica de los linfocitos T y la alta propensión del virus a mutar parecen promover una tasa elevada de infección crónica. La hepatitis crónica puede progresar a fibrosis hepática que conduce a su vez a cirrosis, enfermedad hepática de fase final, y HCC (carcinoma hepatocelular), convirtiéndola en la causa líder de los trasplantes de hígado.

30 Existen 6 genotipos principales de HCV y más de 50 subtipos, que están distribuidos geográficamente de modo diferente. El HCV tipo 1 es el genotipo predominante en Europa y en los Estados Unidos. La extensiva heterogeneidad genética del HCV tiene implicaciones diagnósticas y clínicas importantes, explicando quizás los obstáculos en el desarrollo de vacunas y la falta de respuesta a la terapia.

40 La transmisión del HCV puede ocurrir por contacto con sangre o productos de sangre contaminados, por ejemplo después de transfusiones de sangre o uso de fármacos intravenosos. La introducción de tests de diagnóstico utilizados en la selección de sangre ha conducido a una tendencia decreciente en la incidencia del HCV post-transfusión. Sin embargo, dada la lenta progresión a la enfermedad hepática de fase final, las infecciones existentes continuarán presentando una carga médica y económica importante durante décadas.

45 Las terapias actuales del HCV están basadas en interferón-alfa (IFN- α) (pegilado) en combinación con ribavirina. Esta terapia de combinación proporciona una respuesta virológica sostenida en más del 40% de los pacientes infectados por los virus del genotipo 1 y aproximadamente 80% de los infectados por los genotipos 2 y 3. Además de la eficacia limitada sobre el HCV tipo 1, esta terapia de combinación tiene efectos secundarios importantes y es mal tolerada en muchos pacientes. Los efectos secundarios principales incluyen síntomas parecidos a la gripe, anormalidades hematológicas, y síntomas neuropsiquiátricos. Por tanto existe necesidad de tratamientos más eficaces, cómodos y mejor tolerados.

50 Recientemente, dos inhibidores peptidomiméticos de la proteasa del HCV han ganado atención como candidatos clínicos, a saber BILN-2061 descrito en WO 00/59929 y VX-950 descrito en WO 03/87092. Cierta número de inhibidores similares de la proteasa del HCV han sido descritos también en la bibliografía académica y de patentes. Se ha puesto de manifiesto que la administración sostenida de BILN-2061 o VX-950 selecciona mutantes de HCV que son resistentes al fármaco respectivo, denominados mutantes de escape de fármaco. Estos mutantes de escape de fármaco tienen mutaciones características en el genoma de la proteasa del HCV, particularmente D168V, D168A y/o A156S. De acuerdo con ello, se requieren fármacos adicionales con modelos de resistencia diferentes para proporcionar opciones de tratamiento a los pacientes que fallan, y es probable que la terapia de combinación con fármacos múltiples sea la norma en el futuro, incluso para tratamiento de primera línea.

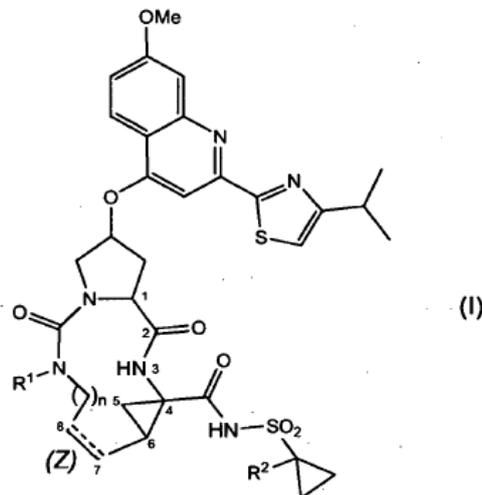
60 La experiencia con los fármacos del HIV, y en particular los inhibidores de la proteasa de HIV, ha puesto de manifiesto adicionalmente que la farmacocinética subóptima y los regímenes de dosificación complejos dan rápidamente como resultado fallos de cumplimiento involuntarios. Esto significa a su vez que la concentración valle de 24 horas (concentración mínima en plasma) para los fármacos respectivos en un régimen de HIV cae frecuentemente por

debajo del umbral CI_{90} o DE_{90} durante largas partes del día. Se considera que un nivel valle de 24 horas de al menos la CI_{50} , y más realísticamente, la CI_{90} o DE_{90} , es esencial para ralentizar el desarrollo de mutantes de escape de fármaco.

- 5 La consecución de la farmacocinética necesaria y el metabolismo de los fármacos para permitir tales niveles valle constituyen un reto difícil para el diseño de fármacos. La naturaleza peptidomimética fuerte de los inhibidores de la proteasa del HCV de la técnica anterior, con enlaces peptídicos múltiples, plantea obstáculos farmacocinéticos para regímenes de dosificación eficaces.
- 10 Existe necesidad de inhibidores de HCV que puedan contrarrestar las desventajas de la terapia actual de HCV tales como efectos secundarios, eficacia limitada, aparición de resistencia, y fallos de cumplimiento.

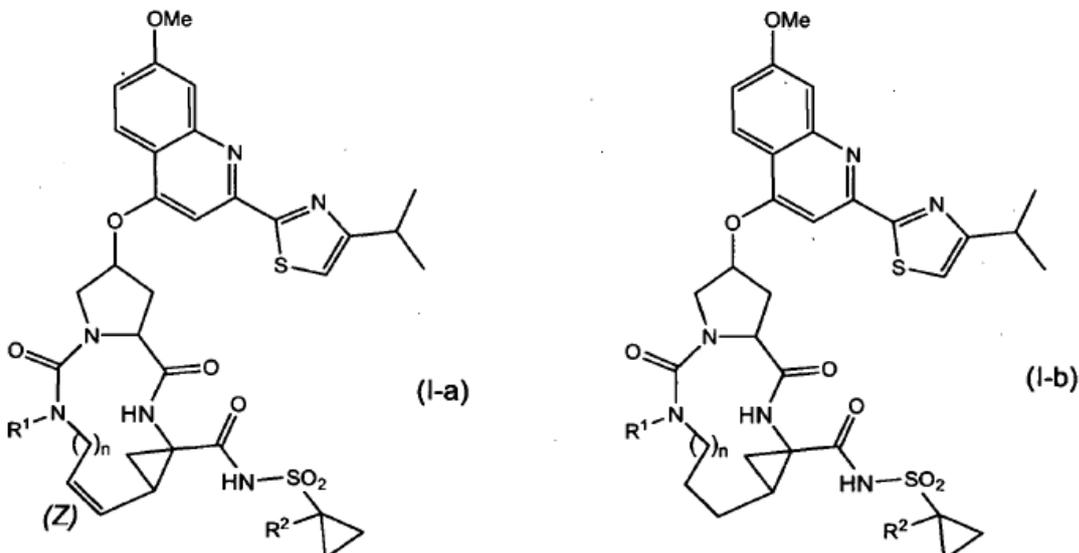
La presente invención concierne a inhibidores del HCV que son superiores en una o más de las propiedades afines farmacológicas siguientes, a saber potencia, citotoxicidad reducida, farmacocinética mejorada, perfil de resistencia mejorado, dosificación aceptable y carga de píldoras.

15 La presente invención concierne a inhibidores de la replicación del HCV, que pueden representarse por la fórmula (I):



- 20 y los *N*-óxidos, sales, y estereoisómeros de los mismos, en donde la línea de trazos representa un enlace doble opcional entre los átomos C7 y C8;
 R^1 es hidrógeno o C_{1-6} alquilo;
 R^2 es hidrógeno o C_{1-6} alquilo; y
 n es 3, 4, 5, ó 6.

25 La presente invención concierne a dos subgrupos de inhibidores de la replicación de HCV, que pueden representarse por la fórmula (I-a) y (I-b):



y los *N*-óxidos, sales, y estereoisómeros de los mismos, en donde R^1 , R^2 y n son como se define en esta memoria.

5 La invención se refiere adicionalmente a métodos para la preparación de los compuestos de fórmula (I), los *N*-óxidos, sales de adición, y formas estereoquímicamente isómeras de los mismos, sus compuestos intermedios, y el uso de los compuestos intermedios en la preparación de los compuestos de fórmula (I).

10 La invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) *per se*, los *N*-óxidos, sales de adición y formas estereoquímicamente isómeras de los mismos, para uso como medicamento. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo y una cantidad anti-viralmente eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se especifica en esta memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender combinaciones de los compuestos arriba mencionados con otros agentes anti-HCV. La invención se refiere adicionalmente a las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente para administración a un individuo que sufre infección de HCV.

15 La invención se refiere también al uso de un compuesto de fórmula (I), o un *N*-óxido, sal de adición, o formas estereoquímicamente isómeras del mismo, para la fabricación de un medicamento para inhibición de la replicación del HCV. O bien, la divulgación se refiere a un método de inhibición de la replicación del HCV en un animal de sangre caliente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), o un *N*-óxido, sal de adición, amina cuaternaria, complejo metálico, o formas estereoquímicamente isómeras del mismo.

20 Como se utilizan en lo que antecede y más adelante en esta memoria, se aplican las definiciones siguientes a no ser que se indique otra cosa.

25 Como se utiliza en esta memoria, "C₁₋₆alquilo" como grupo o parte de un grupo define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tales como por ejemplo metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-1-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 2-metil-1-butilo, 2-metil-1-pentilo, 2-etil-1-butilo, 3-metil-2-pentilo, y análogos. De interés entre C₁₋₆alquilo es C₁₋₄alquilo.

30 Siempre que se utilice más adelante en esta memoria, debe entenderse que los términos "compuestos de fórmula (I)", o "los presentes compuestos" o términos similares, incluyen los compuestos de fórmula (I), todos y cada uno de sus subgrupos, sus *N*-óxidos, sales de adición, y formas estereoquímicamente isómeras. Una realización comprende los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I) especificados en esta memoria, así como los *N*-óxidos, sales y las posibles formas estereoisómeras de los mismos. Otra realización comprende los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I) especificados en esta memoria, así como las sales como las posibles formas estereoisómeras de los mismos.

35 Los compuestos de fórmula (I) tienen varios centros de quiralidad y existen como formas estereoquímicamente isómeras. El término "formas estereoquímicamente isómeras" tal como se utiliza en esta memoria define todos los compuestos posibles constituidos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes que no son intercambiables, que pueden poseer los compuestos de fórmula (I).

40 Con referencia a los casos en que se utiliza (*R*) o (*S*) para designar la configuración absoluta de un átomo quiral dentro de un sustituyente, la designación se realiza teniendo en consideración el compuesto como un todo y no el sustituyente aisladamente considerado.

45 A no ser que se mencione o indique otra cosa, la designación química de un compuesto abarca la mixtura de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles, que puede poseer dicho compuesto. Dicha mixtura puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de la presente invención, tanto en forma pura como mezclados unos con otros deben considerarse abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

50 Las formas estereoisómeras puras de los compuestos y compuestos intermedios como se mencionan en esta memoria se definen como isómeros sustancialmente exentos de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o compuestos intermedios. En particular, el término "estereoisómeramente puro" concierne a compuestos o compuestos intermedios que tienen un exceso de estereoisómero de al menos 80% (es decir como mínimo 90% de un isómero y como máximo 10% de los otros isómeros posibles) hasta un exceso de estereoisómero de 100% (es decir 100% de un isómero y nada del otro u otros), de modo más particular, compuestos o compuestos intermedios que tienen un exceso de estereoisómero de 90% hasta 100%, de modo aún más particular que tienen un exceso de estereoisómero de 94% hasta 100% y de modo muy particular que tienen un exceso de estereoisómero de 97% hasta 100%. Los términos "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" deben entenderse de manera similar, pero haciendo relación entonces al exceso enantiomérico, y el exceso diastereomérico, respectivamente, de la mixtura en cuestión.

Las formas estereoisómeras puras de los compuestos y compuestos intermedios de esta invención pueden obtenerse por aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enantiómeros pueden separarse unos de otros por la cristalización selectiva de sus sales diastereoméricas con ácidos o bases ópticamente activos. Ejemplos de los mismos son ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido dituloiltartárico y ácido canfosulfónico. Alternativamente, los enantiómeros pueden separarse por técnicas cromatográficas utilizando fases estacionarias quirales. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras pueden derivarse también de las formas estereoquímicamente isómeras puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, con tal que la reacción transcurra estereoespecíficamente. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizará por métodos estereoespecíficos de preparación. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

Los racematos diastereoméricos de los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse separadamente por métodos convencionales. Métodos de separación física apropiados que pueden emplearse ventajosamente son, por ejemplo, cristalización selectiva y cromatografía, v.g. cromatografía en columna.

Para algunos de los compuestos de fórmula (I), sus *N*-óxidos, sales, solvatos, y los compuestos intermedios utilizados en la preparación de los mismos, la configuración estereoquímica absoluta no se determinó experimentalmente. Una persona experta en la técnica puede determinar la configuración absoluta de tales compuestos utilizando métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, difracción de rayos X.

Debe entenderse también que la presente invención incluye todos los isótopos de los átomos que existen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

El término "profármaco", como se utiliza a lo largo de este texto se refiere a los derivados farmacológicamente aceptables tales como ésteres, amidas y fosfatos, tales que el producto de biotransformación *in vivo* resultante del derivado es el fármaco activo como se define en los compuestos de fórmula (I). La referencia de Goodman y Gilman (The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª edición, McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs", p. 13-15) que describe profármacos se incorpora en esta memoria en líneas generales. Los profármacos tienen preferiblemente una solubilidad excelente en agua, biodisponibilidad incrementada y se metabolizan fácilmente para dar los inhibidores activos *in vivo*. Los profármacos de un compuesto de la presente invención se pueden preparar por modificación de grupos funcionales presentes en el compuesto de tal manera que las modificaciones se escinden, sea por manipulación de rutina o *in vivo*, para dar el compuesto parental.

Se prefieren profármacos éster farmacéuticamente aceptables que son hidrolizables *in vivo* y se derivan de aquellos compuestos de fórmula (I) que tienen un grupo hidroxilo o carboxilo. Un éster hidrolizable *in vivo* es un éster que se hidroliza en el cuerpo humano o animal para producir el ácido o alcohol parental. Ésteres farmacéuticamente aceptables adecuados para carboxi incluyen C₁₋₆alcoximetil-ésteres, por ejemplo metoximetilo, C₁₋₆alcanoiloximetil-ésteres, por ejemplo pivaloiloximetilo, ftalidil-ésteres, ésteres C₃₋₈cicloalcoxycarboniloxiC₁₋₆alquil-ésteres, por ejemplo 1-ciclohexilcarboniloxietilo, 1,3-dioxolen-2-onilmetil-ésteres, por ejemplo 5-metil-1,3-dioxolen-2-onilmetilo; y C₁₋₆alcoxycarboniloxietil-ésteres, por ejemplo 1-metoxicarboniloxietilo, que pueden formarse en cualquier grupo carboxilo en los compuestos de esta invención.

Un éster hidrolizable *in vivo* de un compuesto de la fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo incluye ésteres inorgánicos tales como ésteres fosfato y α -aciloxialquil-éteres y compuestos afines que, como resultado de la hidrólisis *in vivo* del éster se descomponen para dar el grupo hidroxilo parental. Ejemplos de α -aciloxialquil-éteres incluyen acetoximetoxi y 2,2-dimetilpropioniloxi-metoxi. Una selección de grupos formadores de ésteres hidrolizables *in vivo* para hidroxilo incluyen alcanolilo, benzoilo, fenilacetilo y benzoilo y fenilacetilo sustituidos, alcoxycarbonilo (para dar ésteres alquil-carbonato), dialquilcarbamoilo y *N*-(dialquilaminoetil)-*N*-alquilcarbamoilo (para dar carbamatos), dialquilaminoacetilo y carboxiacetilo. Ejemplos de sustituyentes en benzoilo incluyen morfolino y piperazino enlazados por un átomo de nitrógeno por la vía de un grupo metileno a la posición 3 ó 4 del anillo benzoilo.

Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de fórmula (I) son aquéllas en las cuales el contraión es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables pueden encontrar también aplicación, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, sean farmacéuticamente aceptables o no, están incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Debe entenderse que las sales de adición de ácido y base farmacéuticamente aceptables que se mencionan anteriormente en esta memoria comprenden las formas de sal de adición de ácido y base terapéuticamente activas y no tóxicas que son capaces de formar los compuestos de fórmula (I). Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente por tratamiento de la forma de base con dicho ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, v.g. ácido clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácidos análogos; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir etanodioico), malónico,

succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y los ácidos análogos.

- 5 Inversamente, dichas formas de sal pueden convertirse por tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

Los compuestos de fórmula (I) que contienen un protón ácido pueden convertirse también en sus formas de sal de adición no tóxicas de metales o aminas por tratamiento con bases apropiadas orgánicas e inorgánicas. Formas de sales apropiadas con bases comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y alcalinotérreo, v.g. las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y análogos, sales con bases orgánicas, v.g., las sales de benzatina, *N*-metil-D-glucamina, sales de hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y análogos.

- 15 El término sal de adición, como se utiliza anteriormente en esta memoria, comprende también los solvatos que pueden formar los compuestos de fórmula (I), así como las sales de los mismos. Dichos solvatos son por ejemplo hidratos, alcoholatos y análogos.

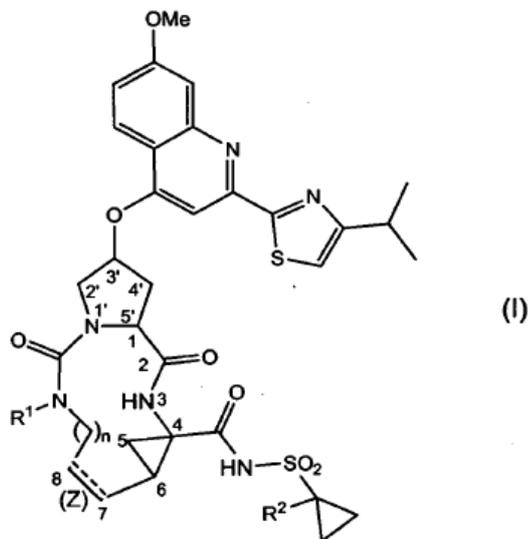
El término "amina cuaternaria", como se utiliza anteriormente en esta memoria, define las sales de amonio cuaternario que son capaces de formar los compuestos de fórmula (I) por reacción entre un nitrógeno básico de un compuesto de fórmula (I) y un agente cuaternizante apropiado, tal como, por ejemplo, un haluro de alquilo, haluro de arilo o haluro de arilalquilo opcionalmente sustituido, v.g. yoduro de metilo o yoduro de bencilo. Pueden utilizarse también otras sustancias reaccionantes con grupos lábiles satisfactorios, tales como trifluorometanosulfonatos de alquilo, metanosulfonatos de alquilo, y *p*-toluenosulfonatos de alquilo. Una amina cuaternaria tiene un nitrógeno cargado positivamente. Contraiones farmacéuticamente aceptables incluyen cloro, bromo, yodo, trifluoroacetato y acetato. El contraión de elección puede introducirse utilizando resinas cambiadoras de iones.

Debe entenderse que las formas de *N*-óxido de los presentes compuestos comprenden los compuestos de fórmula (I) en los cuales uno o varios átomos de nitrógeno están oxidados para formar el denominado *N*-óxido.

Se apreciará que los compuestos de fórmula (I) pueden tener propiedades de fijación de metales, formación de quelatos o formación de complejos y pueden existir por tanto como complejos metálicos o quelatos metálicos. Tales derivados metalados de los compuestos de fórmula (I) deben entenderse incluidos dentro del alcance de la presente divulgación.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden existir también en su forma tautómera. Dichas formas, aunque no se indica explícitamente en la fórmula anterior, deben considerarse incluidas dentro del alcance de la presente invención.

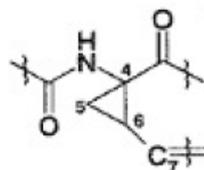
40 Como se ha mencionado arriba, los compuestos de fórmula (I) tienen varios centros asimétricos. Con objeto de hacer referencia más eficientemente a cada uno de estos centros asimétricos, se utilizará el sistema de numeración que se indica en la fórmula estructural siguiente:



45 Existen centros asimétricos en las posiciones 1, 4 y 6 del macrociclo, así como en el átomo de carbono 3' en el anillo de pirrolidina. Cada uno de estos centros asimétricos puede encontrarse en su configuración R o S.

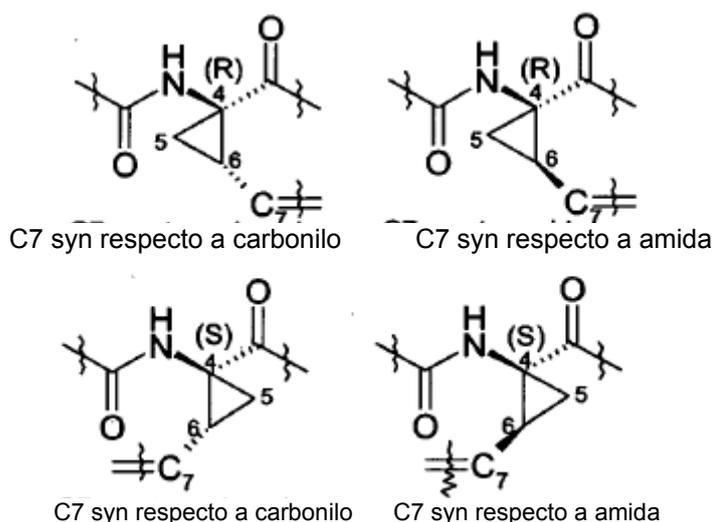
La estereoquímica en la posición 1 corresponde preferiblemente a la de una configuración de L-aminoácido, es decir la de L-prolina.

- 5 Los compuestos de fórmula (I) incluyen un grupo ciclopropilo como se representa en el fragmento estructural siguiente:



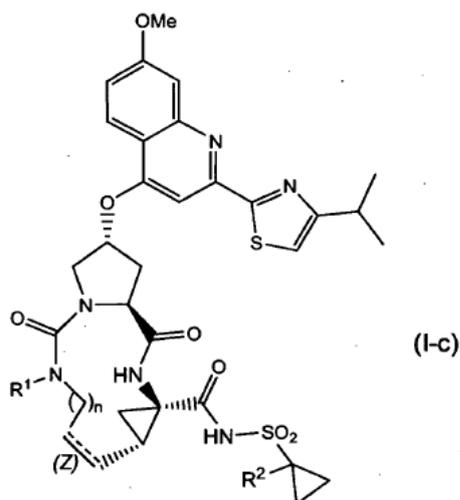
- 10 en donde C₇ representa el carbono en la posición 7 y los carbonos en las posiciones 4 y 6 son átomos de carbono asimétricos del anillo de ciclopropano.

A pesar de otros posibles centros asimétricos en otros segmentos de los compuestos de la invención, la presencia de estos dos centros asimétricos significa que los compuestos pueden existir como mezclas de diastereómeros, tales como los diastereómeros de compuestos de fórmula (I) en la cual el carbono en la posición 7 está configurado en syn con respecto al carbonilo o en syn con respecto a la amida, como se muestra a continuación:



- 20 Una realización concierne a compuestos de fórmula (I) en los cuales el carbono de la posición 7 está configurado en syn respecto al carbonilo. Otra realización concierne a compuestos de fórmula (I) en la cual la configuración en el átomo de carbono de la posición 4 es R. Un subgrupo específico de compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los cuales el carbono de la posición 7 tiene la configuración syn respecto al carbonilo y en los cuales la configuración en el carbono de la posición 4 es R.
- 25

- Los compuestos de fórmula (I) incluyen asimismo un residuo prolina. Se prefieren los compuestos de fórmula (I) en los cuales el sustituyente en la posición 1 (o 5') y el sustituyente en la posición 3' tienen la configuración trans. De particular interés son los compuestos de fórmula (I) en los cuales la posición 1 tiene la configuración correspondiente a L-prolina y el sustituyente en la posición 3' tiene una configuración trans con respecto a la posición 1. Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) tienen la estereoquímica que se indica a continuación en la estructura de la fórmula (I-c) siguiente:
- 30



Preferiblemente, la línea de trazos es un enlace doble entre los átomos de carbono 7 y 8 en los compuestos de fórmula (I), (I-c) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Más preferiblemente, dicho doble enlace entre los átomos de carbono 7 y 8 se encuentra en configuración *cis*.

Debe sobreentenderse que se considera que el subgrupo arriba definido de compuestos de fórmulas (I-b), al igual que cualquier otro subgrupo definido en esta memoria, comprende también cualesquiera *N*-óxidos, sales de adición, aminas cuaternarias, complejos metálicos y formas estereoquímicamente isómeras de tales compuestos.

Cuando *n* es 2, el resto -CH₂- delimitado por "n" corresponde a etanodiilo en los compuestos de fórmula (I) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Cuando *n* es 3, el resto -CH₂- delimitado por "n" corresponde a propanodiilo en los compuestos de fórmula (I) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Cuando *n* es 4, el resto -CH₂- delimitado por "n" corresponde a butanodiilo en los compuestos de fórmula (I) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Cuando *n* es 5, el resto -CH₂- delimitado por "n" corresponde a pentanodiilo en los compuestos de fórmula (I) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Cuando *n* es 6, el resto -CH₂- delimitado por "n" corresponde a hexanodiilo en los compuestos de fórmula (I) o en cualquier subgrupo de compuestos de fórmula (I). Subgrupos particulares de los compuestos de fórmula (I) son aquellos compuestos en los cuales *n* es 4 ó 5.

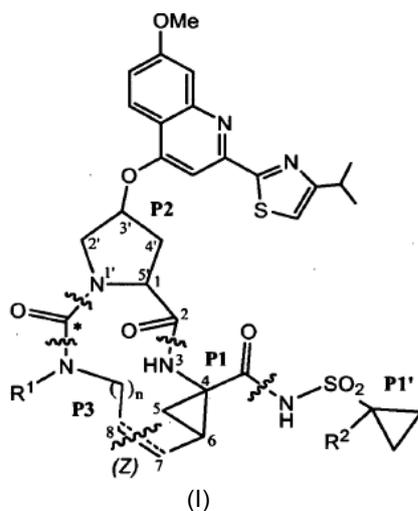
Realizaciones preferidas de la invención son compuestos de fórmula (I) o cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) en los cuales R¹ es hidrógeno o metilo.

Realizaciones de la invención son aquellos compuestos de fórmula (I) o cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) en la cual R² es hidrógeno, o C₁₋₄alquilo, es decir metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *terc*-butilo, o isobutilo.

Un subgrupo de compuestos de la invención son aquellos compuestos de fórmula (I) o cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) en donde R² es hidrógeno.

Otro subgrupo de compuestos de la invención son aquellos compuestos de fórmula (I) o cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) en donde R² es metilo.

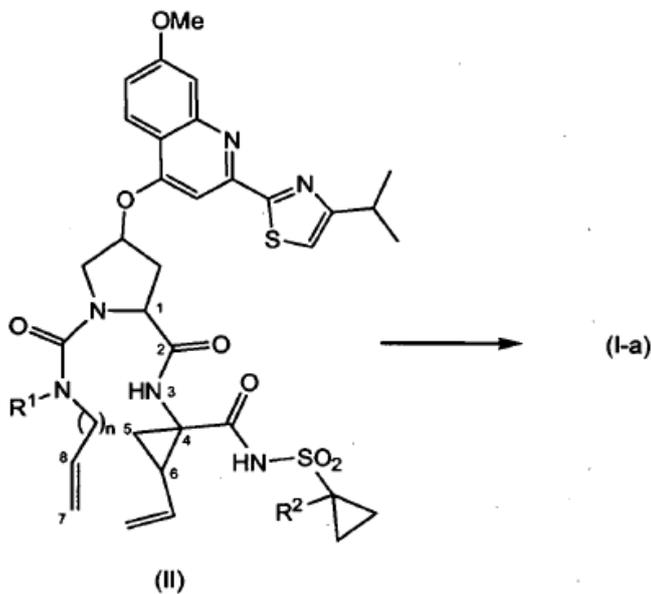
Los compuestos de fórmula (I) están constituidos por tres bloques de construcción principales P1, P2, y P3, que están delimitados cada uno por una línea curva sinusoidal. El bloque de construcción P1 contiene adicionalmente una cola P1'. El grupo carbonilo marcado con un asterisco puede ser parte del bloque de construcción P2 o del bloque de construcción P3. El enlace de los bloques de construcción P1 con P2, P2 con P3, y P1 con P1' implica una formación de enlace amida. El enlace de los bloques P1 y P3 implica una formación de enlace doble. El enlace de los bloques de construcción P1, P1', P2 y P3 para preparar los compuestos de fórmula (I) puede hacerse en cualquier secuencia dada. Uno de los pasos implica una ciclación por la cual se forma el macrociclo.



5 Debe entenderse que los procedimientos de síntesis descritos más adelante en esta memoria son aplicables tanto para los racematos, los compuestos intermedios estereoquímicamente puros o los productos finales, como para cualesquiera mezclas de estereoisómeros. Los racematos o mixturas estereoquímicas pueden separarse en formas estereoisómeras en cualquier etapa de los procedimientos de síntesis. En una realización, los compuestos intermedios y productos finales tienen la estereoquímica especificada anteriormente en los compuestos de fórmula (I-c).

10 En una realización, los compuestos (I) se preparan formando primeramente los enlaces amida y formando subsiguientemente la unión por enlace doble entre P3 y P1 con ciclación concomitante para dar el macrociclo.

15 En una realización preferida, los compuestos (I) en donde el enlace entre C₇ y C₈ es un enlace doble, que son compuestos de fórmula (I-a), como se define arriba, pueden prepararse como se reseña en el esquema de reacción siguiente:



20 La formación del macrociclo puede llevarse a cabo con una reacción de metátesis de olefinas en presencia de un catalizador metálico adecuado tal como v.g. el catalizador basado en Ru consignado por Miller, S.J., Blackwell, H.E., Grubbs, R.H. J. Am. Chem. Soc. 118, (1996), 9606-9614; Kingsbury, J. S., Harrity, J. P. A., Bonitatebus, P. J., Hoveyda, A. H., J. Am. Chem. Soc. 121, (1999), 791-799; y Huang et al., J. Am. Chem. Soc. 121, (1999), 2674- 2678; por ejemplo, un catalizador Hoveyda-Grubbs.

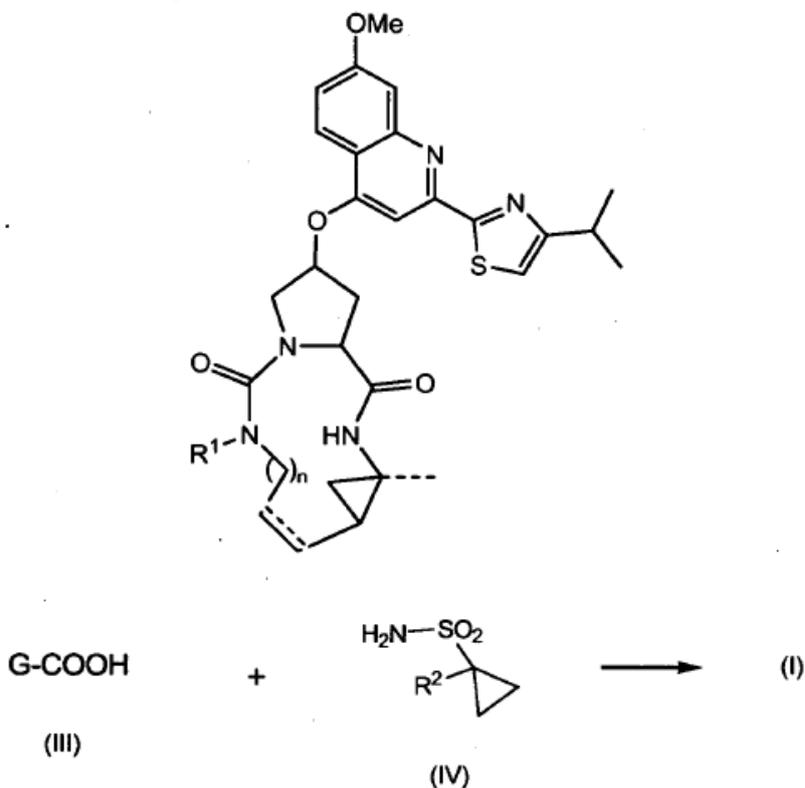
25 Pueden utilizarse catalizadores de rutenio estables al aire tales como cloruro de bis(triciclohexilfosfina)-3-fenil-1H-inden-1-ilideno-rutenio (Neolyst M1®) o dicloruro de bis(triciclohexilfosfina)-[(feniltio)metileno]rutenio (IV). Otros catalizadores que pueden utilizarse son los catalizadores de Grubbs de primera y segunda generación, es decir bencilideno-bis(triciclohexilfosfina)diclororrutenio y (1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)-dicloro(fenilmetileno)-(triciclohexilfosfina)rutenio, respectivamente. De interés particular son los catalizadores Hoveyda-Grubbs de primera y segunda generación, que son dicloro(o-isopropoxifenilmetileno)(triciclohexilfosfina)-rutenio (II) y 1,3-bis-(2,4,6-

trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro (o-isopropoxifenilmetileno)rutenio, respectivamente. Asimismo pueden utilizarse para esta reacción otros catalizadores que contienen otros metales de transición tales como Mo.

5 Las reacciones de metátesis pueden conducirse en un disolvente adecuado tal como por ejemplo éteres, v.g. THF, dioxano; hidrocarburos halogenados, v.g. diclorometano, CHCl_3 , 1,2-dicloroetano y análogos. En una realización preferida, la reacción de metátesis se conduce en tolueno. Estas reacciones se conducen a temperaturas incrementadas en atmósfera de nitrógeno.

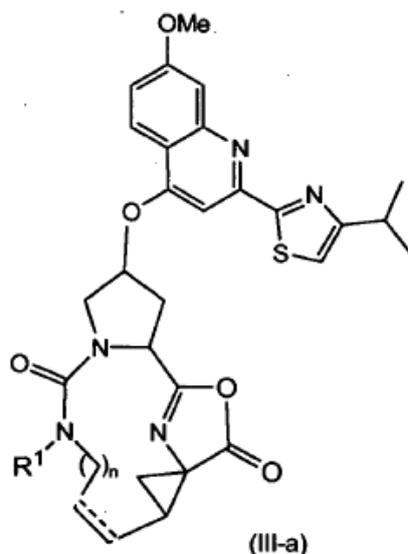
10 Los compuestos de fórmula (I) en los cuales el enlace entre C7 y C8 en el macrociclo es un enlace simple, es decir los compuestos de fórmula (I-b), se pueden preparar a partir de los compuestos de fórmula (I-a) por una reducción del enlace doble C7-C8 en los compuestos de fórmula (I-a). Esta reducción se puede conducir por hidrogenación catalítica con hidrógeno en presencia de un catalizador de metal noble tal como, por ejemplo, Pt, Pd, Rh, Ru o níquel Raney. De particular interés es Rh sobre alúmina. La reacción de hidrogenación se conduce preferiblemente en un disolvente tal como, v.g. un alcohol tal como metanol, etanol, o un éter tal como THF, o mixturas de los mismos. Puede añadirse también agua a estos disolventes o mixturas de disolventes.

15 La cola P1' puede conectarse al bloque de construcción P1 en cualquier etapa de la síntesis, es decir antes o después de la ciclación, o antes o después de la ciclación y reducción como se describe anteriormente en esta memoria. P1' puede enlazarse a P1 por formación de un enlace amida entre ambos restos. En una realización, el grupo P1' se introduce en el último paso de la síntesis de los compuestos (I) como se reseña en el esquema de reacción siguiente en el que G representa un grupo:

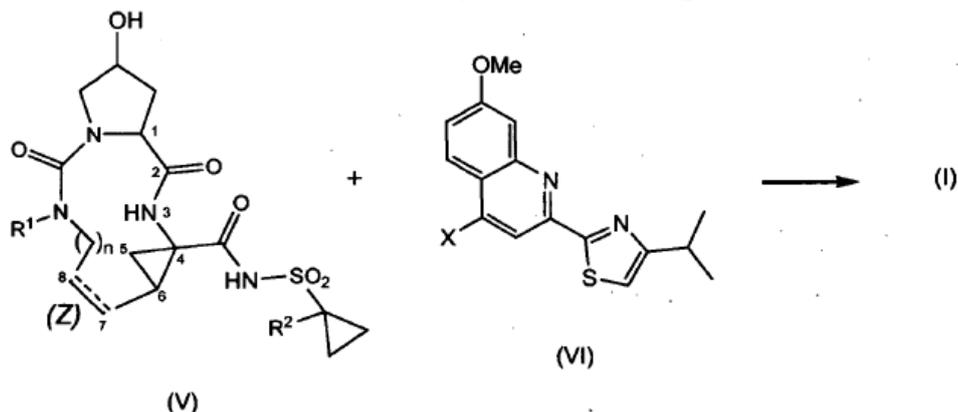


25 En este procedimiento, se hace reaccionar una ciclopropilsulfonamida (IV) con un compuesto intermedio (III) por la vía de una reacción de formación de amida tal como cualquiera de los procedimientos para la formación de un enlace amida descritos más adelante en esta memoria. En particular, (III) puede tratarse con un agente de acoplamiento, por ejemplo *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), EEDQ, IIDQ, EDCI o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-trispirrolidinofosfonio (disponible comercialmente como PyBOP®), en un disolvente como THF, seguido por reacción con la ciclopropilsulfonamida (IV) deseada en presencia de una base, por ejemplo una trialkilamina tal como trietilamina o diisopropiletilamina, o 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-eno (DBU) o diisopropiletilamina.

30 La activación del ácido carboxílico en (III) como se describe en las reacciones anteriores puede conducir a una reacción de ciclación interna para dar un compuesto intermedio de azalactona de fórmula



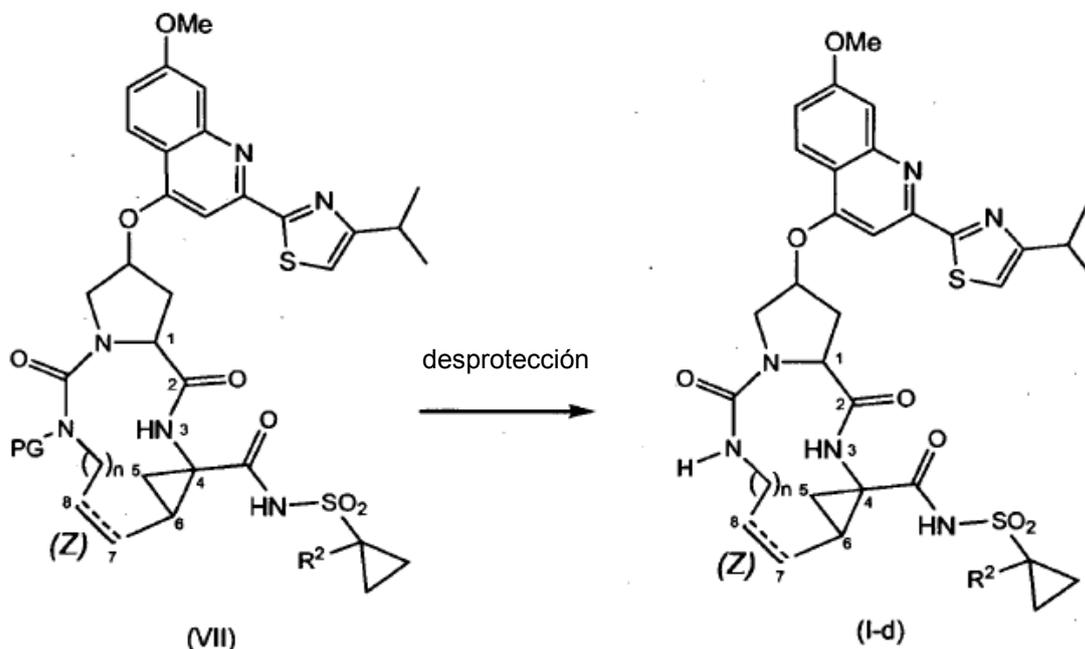
- 5 donde R^1 y n son como se ha especificado arriba y en donde los centros estereogénicos pueden tener la configuración estereoquímica que se ha especificado arriba, en particular como en (I-c). Los compuestos intermedios (III-a) pueden aislarse de la mixtura de reacción, utilizando metodología convencional, y el compuesto intermedio aislado (III-a) se hace reaccionar luego con (IV), o la mixtura de reacción que contiene (III-a) puede hacerse reaccionar adicionalmente con (IV) sin aislamiento de (III-a). En una realización, en la que la reacción con el agente de acoplamiento se conduce en un disolvente inmiscible con el agua, la mixtura de reacción que contiene (III-a) puede lavarse con agua o con agua ligeramente básica a fin de eliminar todos los productos secundarios solubles en agua. La solución lavada así obtenida puede hacerse reaccionar luego con (IV) sin pasos de purificación adicionales. Por otra parte, el aislamiento de los compuestos intermedios (III-a) puede proporcionar ciertas ventajas en el sentido de que el producto aislado, después de purificación opcional adicional, puede hacerse reaccionar con (IV), dando lugar a menos productos secundarios y a un acabado más fácil de la reacción.
- 10
- 15 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar también por eterificación de un compuesto intermedio (V) con una quinoleína de fórmula (VI) como se reseña en el esquema de reacción siguiente:



- 20 X en (VI) representa hidroxilo o un grupo lábil tal como un haluro, v.g. bromuro o cloruro, o un grupo arilsulfonilo, v.g. mesilato, triflato o tosilato y análogos.
- 25 En una realización, la reacción de (V) con (VI) es una reacción de arilación en O y X representa un grupo lábil. Esta reacción puede conducirse siguiendo los procedimientos descritos por E.M. Smith et al. (J. Med. Chem. (1988), 31, 875-885). En particular, esta reacción se conduce en presencia de una base, preferiblemente una base fuerte, en un disolvente inerte en la reacción, v.g. uno de los disolventes mencionados para la formación de un enlace amida.
- 30 En una realización, el material de partida (V) se hace reaccionar con quinoleína (VI) en presencia de una base que es lo bastante fuerte para sustraer un hidrógeno del grupo hidroxilo, por ejemplo un álcali o hidruro de metal alcalino tal como LiH o hidruro de sodio, o alcóxido de metal alcalino tal como metóxido o etóxido de sodio o potasio, *tert*-butóxido de potasio, en un disolvente inerte en la reacción como un disolvente aprótico dipolar, v.g. DMA, DMF y análogos. El alcoholato resultante se hace reaccionar con el agente de arilación (VII), en donde X es un grupo lábil adecuado como se ha mencionado arriba. La conversión de (V) en (I) utilizando un tipo de reacción de arilación en O no cambia la configuración estereoquímica en el carbono que lleva el grupo hidroxilo u O-quinoleína.

Alternativamente, la reacción de (V) con (VI) puede conducirse también por una reacción de Mitsunobu (Mitsunobu, 1981, Synthesis, enero, 1-28; Rano et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 22, 3779-3792; Krchnak et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 5, 6193-6196; Richter et al. Tetrahedron Lett., 1994, 35, 27, 4705-4706). Esta reacción comprende tratamiento del compuesto intermedio (V) con quinoleína (VI) en donde Y es hidroxilo, en presencia de trifetilfosfina y un agente de activación tal como un azocarboxilato de dialquilo, v.g. azodicarboxilato de dietilo (DEAD), azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), o análogos. La reacción de Mitsunobu cambia la configuración estereoquímica en el carbono que lleva el grupo hidroxilo u O-quinoleína.

Los compuestos de fórmula (I) en donde R^1 es hidrógeno, compuestos que se representan por (I-d) se pueden preparar también a partir de un compuesto intermedio (VII) correspondiente protegido en el nitrógeno en donde PG representa un grupo protector de nitrógeno. Grupos protectores de N adecuados se describen más adelante en esta memoria. En una realización, PG en (VII) es bencilo o bencilo sustituido, en particular 4-metoxibencilo.



Los materiales de partida (VII) en la reacción anterior se pueden preparar siguiendo los procedimientos descritos para la preparación de los compuestos de fórmula (I), pero utilizando compuestos intermedios en los cuales el grupo R^1 es PG.

Alternativamente, para preparar los compuestos de fórmula (I), se forma primeramente un enlace amida entre los bloques de construcción P2 y P1, seguido por acoplamiento del bloque de construcción P3 al resto P1 en P1-P2, y una formación subsiguiente de enlace amida entre P3 y el resto P2 en P2-P1-P3 con cierre concomitante de anillo. Una vez más, la cola P1' puede unirse al bloque de construcción P1 en cualquier etapa de la síntesis de los compuestos de fórmula (I), por ejemplo antes o después del acoplamiento de los bloques de construcción P2 y P1; antes o después del acoplamiento de bloque de construcción P3 a P1; o antes o después del acoplamiento de los bloques de construcción P3 y P2 y el cierre de anillo concomitante.

Todavía otra metodología alternativa de síntesis es la formación de un enlace amida entre los bloques de construcción P2 y P3, seguida por el acoplamiento del bloque de construcción P1 a P3, y una formación final de enlace amida entre P1 y P2 con cierre concomitante de anillo. Una vez más, la cola P1' puede unirse al bloque de construcción P1 en cualquier etapa de la síntesis de los compuestos de fórmula (I), es decir, en el caso presente, antes o después del acoplamiento de los bloques de construcción P2 y P3; antes o después del acoplamiento de los bloques de construcción P1 y P3; o antes o después del acoplamiento de P1 y P2 con cierre de anillo concomitante.

Los bloques de construcción P1 y P3 pueden enlazarse por formación de enlace doble en los carbonos 7 y 8, si se desea, seguido por una reducción del enlace doble C7-C8. El bloque P1-P3 así formado puede acoplarse al bloque de construcción P2 y ciclarse subsiguientemente, por formación de enlaces amida. En una realización preferida, el bloque de construcción P1-P3 no se reduce y se acopla como tal con P2 y se cicla, obteniéndose compuestos (I-1).

Los bloques de construcción P1 y P3 en cualquiera de los enfoques anteriores pueden enlazarse por formación de enlace doble, v.g. por la reacción de metátesis de olefinas descrita anteriormente en esta memoria, o por una reacción de tipo Wittig.

Debe indicarse que en los compuestos de fórmula (I), la formación de enlaces amida entre los bloques P2 y P3 puede tener lugar en dos posiciones diferentes del resto urea. Una primera formación de enlace amida implica la reacción del nitrógeno del anillo pirrolidina con el carbonilo adyacente activado (marcado con un asterisco) que forma parte del bloque de construcción P3. Una segunda formación alternativa de enlace amida implica la reacción del carbonilo activado que lleva el asterisco y que forma parte del bloque de construcción P2 con un grupo NHRR¹, en donde R¹ es como se define para los compuestos de fórmula (I) o un subgrupo de los mismos, y en donde R¹ puede ser adicionalmente un grupo protector de nitrógeno; y R es el resto alquilo P3. El carbonilo activado marcado con el asterisco puede introducirse por reacción de la pirrolidina o el NHRR¹ amínico con fosgeno o un derivado de fosgeno.

Los bloques de construcción individuales pueden prepararse primeramente y acoplarse seguidamente unos a otros o, alternativamente, los precursores de los bloques de construcción pueden acoplarse unos a otros y modificarse en una etapa posterior para dar la composición molecular deseada.

Las funcionalidades en cada uno de los bloques de construcción pueden protegerse para evitar reacciones secundarias.

La formación de enlaces amida puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándar tales como los utilizados para el acoplamiento de aminoácidos en la síntesis de péptidos. Lo último implica el acoplamiento deshidratante de un grupo carboxilo de una sustancia reaccionante con un grupo amino de la otra sustancia reaccionante para formar una unión amídica enlazadora. La formación del enlace amida puede realizarse por reacción de los materiales de partida en presencia de un agente de acoplamiento o por conversión de la funcionalidad carboxilo en una forma activa tal como un éster activo, anhídrido mixto o un cloruro o bromuro de ácido carboxílico. Descripciones generales de tales reacciones de acoplamiento y los reactivos utilizados en ellas pueden encontrarse en libros de texto generales sobre química de péptidos, por ejemplo, M. Bodanszky, "Peptide Chemistry", 2ª edición revisada, Springer-Verlag, Berlín, Alemania, (1993).

Ejemplos de reacciones de acoplamiento con formación de enlace amida incluyen el método de la azida, el método del anhídrido de ácido mixto carbónico-carboxílico (cloroformiato de isobutilo), el método de la carbodiimida (diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o carbodiimida soluble en agua tal como *N*-etil-*N'*-[(3-dimetilamino)propil]carbodiimida), el método del éster activo (*p*-nitrofenil-éster, *N*-hidroxisuccínico-imido éster), el método del reactivo K de Woodward, el método del 1,1-carbonildiimidazol (CDI o *N,N'*-carbonildiimidazol), los reactivos de fósforo o métodos de oxidación-reducción. Algunos de estos métodos pueden mejorarse por adición de catalizadores adecuados, v.g. en el método de la carbodiimida por adición de 1-hidroxibenzotriazol, DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno), o 4-DMAP. Agentes de acoplamiento adicionales son hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio, sea por sí mismo o en presencia de 1-hidroxibenzotriazol o 4-DMAP; o tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetra-metiluronio, o hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio. Estas reacciones de acoplamiento pueden realizarse en solución (fase líquida) o en fase sólida.

Una formación preferida de enlace amida se realiza empleando *N*-etiloxicarbonil-2-etiloxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ) o *N*-isobutiloxi-carbonil-2-isobutiloxi-1,2-dihidroquinoleína (IIDQ). Al contrario que el procedimiento clásico del anhídrido, EEDQ y IIDQ no requieren base ni temperaturas de reacción bajas. Típicamente, el procedimiento implica hacer reaccionar cantidades equimolares de los componentes carboxilo y amina en un disolvente orgánico (puede utilizarse una gran diversidad de disolventes). A continuación se añade EEDQ o IIDQ en exceso y la mixtura se deja en agitación a la temperatura ambiente.

Las reacciones de acoplamiento se conducen preferiblemente en un disolvente inerte, tal como hidrocarburos halogenados, v.g. diclorometano, cloroformo, disolventes apróticos dipolares tales como acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilacetamida, DMSO, HMPT, éteres tales como tetrahidrofurano (THF).

En muchos casos, las reacciones de acoplamiento se realizan en presencia de una base adecuada tal como una amina terciaria, v.g. trietilamina, diisopropilamina (DIPEA), *N*-metilmorfolina, *N*-metilpirrolidina, 4-DMAP o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). La temperatura de reacción puede variar desde 0° a 50°C, y el tiempo de reacción puede estar comprendido entre 15 min y 24 h.

Los grupos funcionales en los bloques de construcción que están enlazados unos a otros pueden protegerse para evitar la formación de enlaces indeseados. Grupos protectores apropiados que pueden utilizarse se citan por ejemplo en Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons. New York: (1999) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 9, Academic Press, Nueva York (1987), al que se hace referencia en lo sucesivo simplemente como Greene.

Los grupos carboxilo pueden protegerse como un éster que se puede escindir para dar el ácido carboxílico. Grupos protectores que pueden utilizarse incluyen 1) alquilésteres tales como metilo, trimetilsililo y *tert*-butilo; 2) arilalquil-

ésteres tales como bencilo y bencilo sustituido; o 3) ésteres que pueden ser escindidos por una base moderada o medios reductores moderados tales como ésteres de tricloroetilo y fenacilo.

Los grupos amino se pueden proteger por una diversidad de grupos N-protectores, tales como:

- 1) grupos acilo tales como formilo, trifluoroacetilo, ftalilo, y *p*-toluenosulfonilo;
- 2) grupos carbamato aromáticos tales como benciloxycarbonilo (Cbz o Z) y benciloxycarbonilos sustituidos, y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc);
- 3) grupos carbamato alifáticos tales como *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), etoxycarbonilo, diisopropilmetoxycarbonilo, y aliloxycarbonilo;
- 4) grupos alquilcarbamato cíclicos tales como ciclopentiloxycarbonilo y adamantiloxycarbonilo;
- 5) grupos alquilo tales como trifenilmetilo, bencilo o bencilo sustituido tales como 4-metoxibencilo;
- 6) trialquilsililo tal como trimetilsililo o *t*.Bu-dimetilsililo; y
- 7) grupos que contienen tiol tales como feniltiocarbonilo y ditiassuccinoilo. Grupos protectores de amino interesantes son Boc y Fmoc.

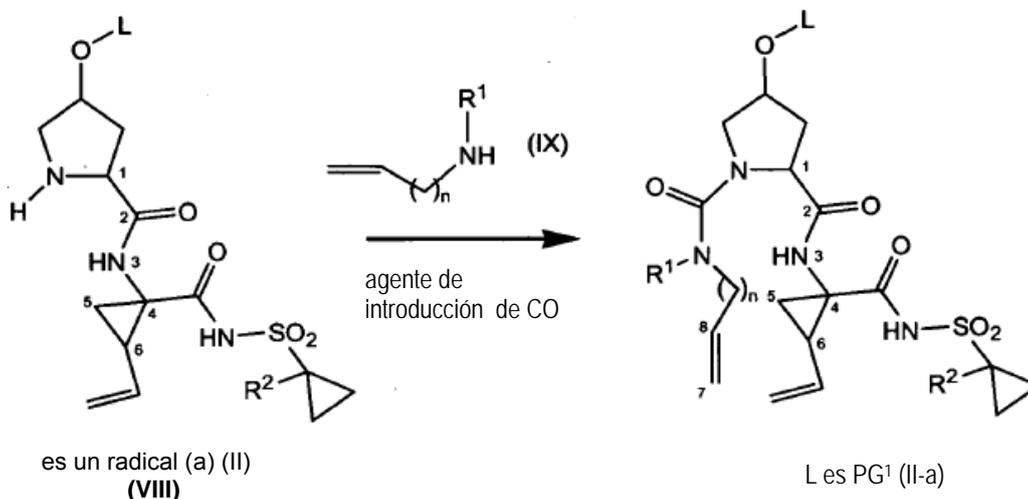
Preferiblemente, el grupo protector de amino se escinde antes del paso de acoplamiento siguiente. La eliminación de los grupos protectores de N puede realizarse siguiendo procedimientos conocidos en la técnica. Cuando se utiliza el grupo Boc, los métodos de elección son ácido trifluoroacético, puro o en diclorometano, o HCl en dioxano o en acetato de etilo. La sal de amonio resultante se neutraliza luego antes del acoplamiento o in situ con soluciones básicas tales como tampones acuosos, o aminas terciarias en diclorometano o acetonitrilo o dimetilformamida. Cuando se utiliza el grupo Fmoc, los reactivos de elección son piperidina o piperidina sustituida en dimetilformamida, pero puede utilizarse cualquier amina secundaria. La desprotección se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 0°C y la temperatura ambiente, usualmente alrededor de 15-25°C, o 20-22°C.

Otros grupos funcionales que pueden interferir en las reacciones de acoplamiento de los bloques de construcción pueden protegerse también. Por ejemplo, los grupos hidroxilo pueden protegerse como éteres bencilicos o éteres bencilicos sustituidos, v.g. 4-metoxibencil-éter, ésteres de benzoilo o ésteres de benzoilo sustituidos, v.g. 4-nitrobenzoil-éster, o con grupos trialquilsililo (v.g. trimetilsililo o *tert*-butildimetilsililo).

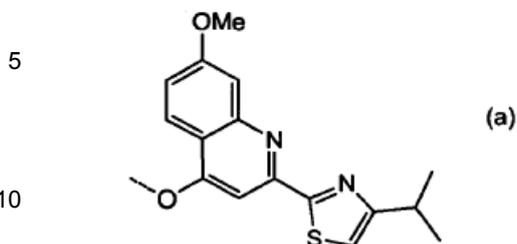
Grupos amino adicionales pueden ser protegidos con grupos protectores que pueden escindirse selectivamente. Por ejemplo, cuando se utiliza Boc como el grupo protector de α -amino, son adecuados los grupos protectores de la cadena lateral siguientes: pueden utilizarse restos *p*-toluenosulfonilo (tosilo) para proteger grupos amino adicionales; pueden utilizarse bencil-(Bn)-éteres para proteger grupos hidroxilo; y pueden utilizarse bencil-ésteres para proteger grupos carboxilo adicionales. O bien, cuando se selecciona Fmoc para la protección de α -amino, usualmente son aceptables grupos protectores basados en *tert*-butilo. Por ejemplo, puede utilizarse Boc para grupos amino adicionales; *tert*-butil-éteres para grupos hidroxilo; y *tert*-butil-ésteres para grupos carboxilo adicionales.

Cualquiera de los grupos protectores puede eliminarse en cualquier etapa del procedimiento de síntesis pero, preferiblemente, los grupos protectores de cualquiera de las funcionalidades no implicadas en los pasos de reacción se eliminan una vez completada la formación del macrociclo. La eliminación de los grupos protectores puede realizarse de cualquier manera que venga dictada por la elección de grupos protectores, maneras que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los compuestos intermedios de fórmula (II) se pueden preparar por reacción de un compuesto intermedio (VIII) con una alquenamina (IX) en presencia de un agente de introducción de carbonilo como se resume en el esquema de reacción siguiente:



L representa un grupo PG¹ protector de O o un grupo

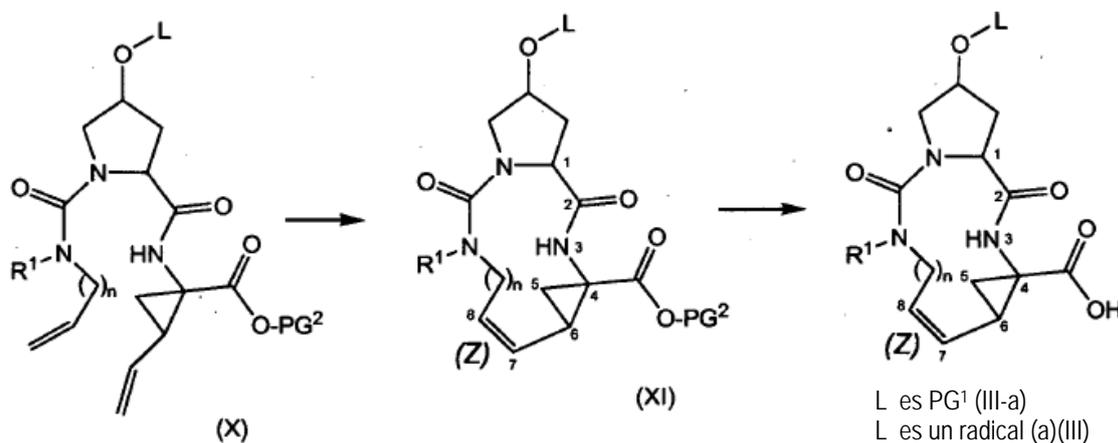


15 El grupo protector de O puede ser cualquiera de los grupos mencionados en esta memoria, y en particular es un grupo benzoilo o benzoilo sustituido tal como 4-nitrobenzoilo.

20 Los agentes de introducción de carbonilo (CO) incluyen fosgeno, o derivados de fosgeno tales como carbonil-diimidazol (CDI), y análogos. En una realización, se hace reaccionar (VIII) con el agente introductor de CO en presencia de una base adecuada y un disolvente, que pueden ser las bases y disolventes utilizados en las reacciones de formación de amida que se han descrito arriba. En una realización particular, la base es un hidrogenocarbonato, v.g. NaHCO₃, o una amina terciaria tal como trietilamina y análogas, y el disolvente es un éter o hidrocarburo halogenado, v.g. THF, CH₂Cl₂, CHCl₃, y análogos. Después de ello, se añade la amina (IX), obteniéndose así los compuestos intermedios (XII) o (XII-a) como en el esquema anterior. Una ruta alternativa que utiliza condiciones de reacción similares implica hacer reaccionar primeramente el agente introductor de CO con la amina (IX) y hacer reaccionar luego el compuesto intermedio así formado con (VIII).

30 Cuando L es PG¹, la reacción de (VIII) con (IX) produce los compuestos intermedios (II-a). Éstos pueden desprotegerse, por ejemplo donde PG¹ es benzoilo o benzoilo constituido, por reacción con un hidróxido de metal alcalino (LiOH, NaOH, KOH), en particular donde PG¹ es 4-nitrobenzoilo, con LiOH, en un medio acuoso que comprende agua y un disolvente orgánico soluble en agua tal como un alcohol (metanol, etanol) y THF. El alcohol resultante (es decir un compuesto intermedio (II-a) en donde L es hidrógeno), se hace reaccionar con un compuesto intermedio (VI) como se ha descrito arriba para la reacción de (V) con (VI), y esta reacción da como resultado los compuestos intermedios (II).

35 Los compuestos intermedios de fórmula (III) se pueden preparar sometiendo primeramente a ciclación un éster intermedio (X) para dar un éster macrocíclico (XI), que se convierte a su vez en el ácido carboxílico macrocíclico co-

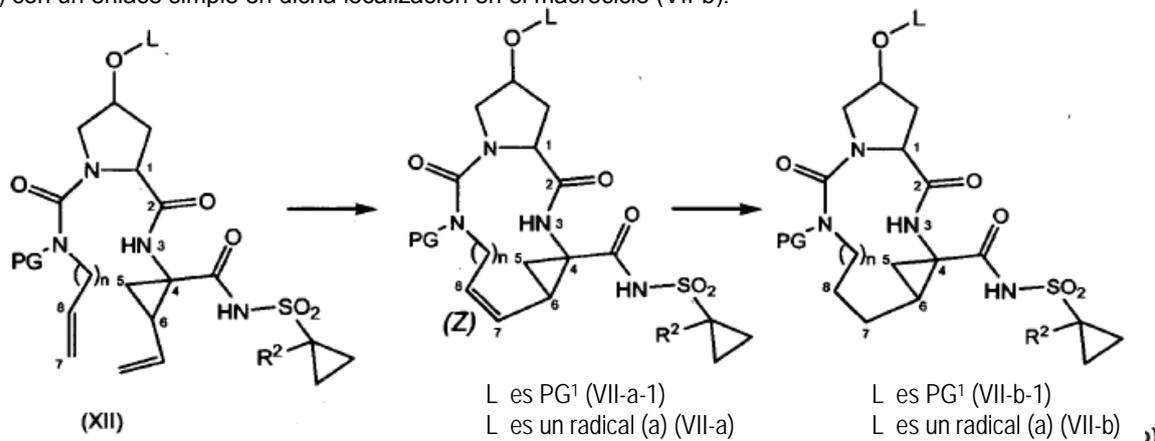


respondiente (III) como sigue:

40 L es como se ha especificado arriba y PG² es un grupo protector de carboxilo, v.g. uno de los grupos protectores de carboxilo arriba mencionados, en particular un grupo C₁₋₄ alquil- o bencil-éster, v.g. un metil-, etil- o *terc*-butil-éster. El grupo PG¹ puede eliminarse utilizando metodologías conocidas en la técnica, v.g. los ésteres metílicos o etílicos por tratamiento con un hidróxido de metal alcalino en medio acuoso, los ésteres *terc*-butílicos con ácido débil y los ésteres bencílicos con ácido fuerte o por hidrogenación catalítica. Donde L es un radical (a), esta secuencia de reacción produce compuestos intermedios (III). Éstos pueden prepararse también por eliminación de L, que es un grupo protector de O, y eterificación del alcohol así formado con el compuesto intermedio (VI) como se ha descrito arriba.

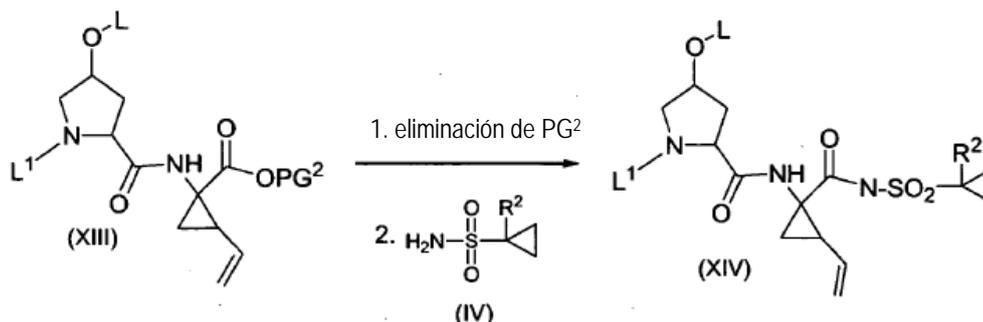
45 Los compuestos intermedios de fórmula (VII) se pueden preparar por ciclación de un compuesto intermedio (XII) en donde PG es un grupo protector de nitrógeno como se ha especificado arriba para los compuestos intermedios (VII)

con un enlace doble en el macrociclo (VII-a), que pueden reducirse a los compuestos intermedios correspondientes (VII) con un enlace simple en dicha localización en el macrociclo (VII-b):

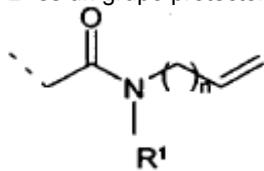


L es como se ha especificado arriba. Donde L es un radical (a), esta secuencia de reacción produce compuestos intermedios (VII-a) o (VII-b). Éstos pueden prepararse también por eliminación de L, que es un grupo protector de O y eterificación del alcohol así formado con un compuesto intermedio (VI) como se ha descrito arriba. El grupo sulfonilamida en la secuencia anterior puede ser un éster (es decir un grupo -OPG² como se ha especificado arriba) que puede eliminarse y condensarse con una ciclopropilamida (IV) siguiendo los procedimientos mencionados anteriormente.

El grupo ciclopropilsulfonamida puede introducirse en cualquier etapa de la síntesis, sea como el último paso como se ha descrito arriba, o antes de la formación del macrociclo como se muestra en el esquema siguiente:



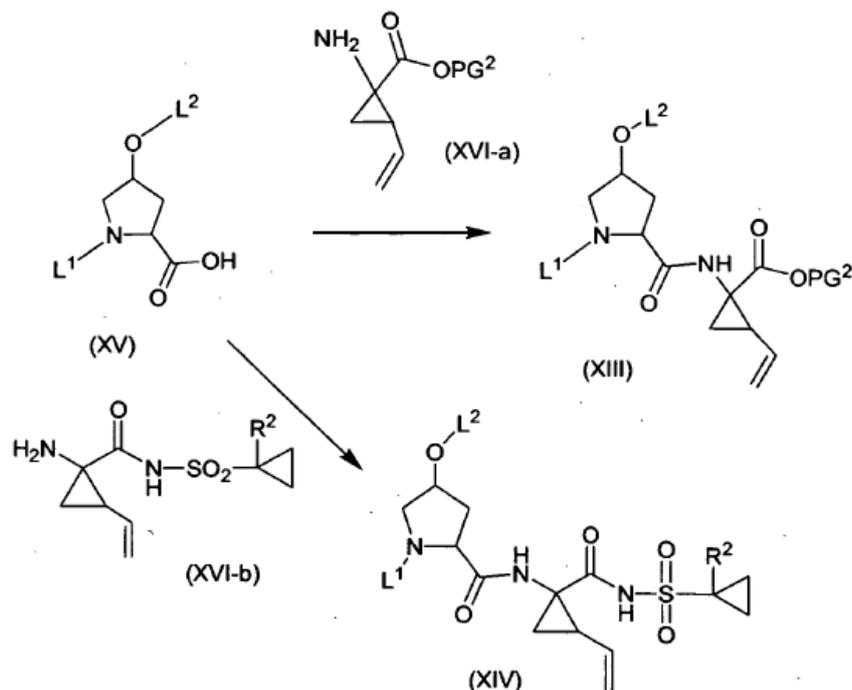
L es como se ha definido arriba, PG² representa un grupo protector de carboxilo, como se ha especificado arriba, y L¹ es un grupo protector de nitrógeno (PG, como se define arriba), o L¹ es un grupo



(b) en donde R¹ y n son como se ha definido arriba, o en donde R¹ puede representar también un grupo protector de nitrógeno (un grupo PG, como se ha especificado arriba). Obviamente, cuando R¹ representa un grupo protector de nitrógeno, dicho grupo puede eliminarse en la etapa deseada de la ruta de síntesis. Los compuestos intermedios (XIV) en donde L¹ representa un grupo (b) corresponden a los compuestos intermedios (II) o (II-a) y pueden procesarse ulteriormente como se ha especificado arriba.

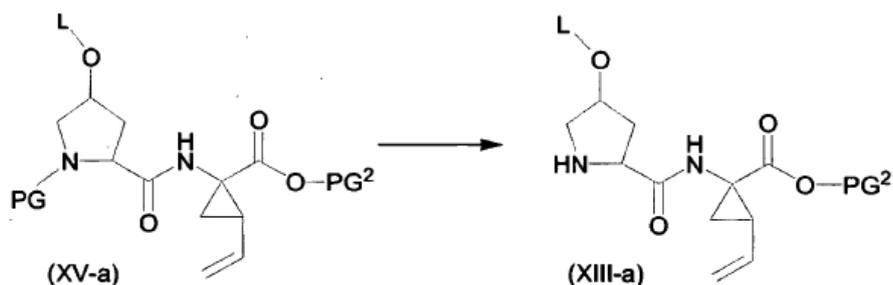
Acoplamiento de los bloques de construcción P1 y P2

Los bloques de construcción P1 y P2 se enlazan utilizando una reacción de formación de amida siguiendo los procedimientos arriba descritos. El bloque de construcción P1 puede tener un grupo protector de carboxilo PG² (como en (XVI-a)) o puede estar ya enlazado al grupo P1' (como en (XVI-b)). L² es hidrógeno o un grupo L como se ha especificado arriba.



5 En el procedimiento del esquema anterior, se acopla un ciclopropil-aminoácido (XVI-a) o (XVI-b) a la función ácida del bloque de construcción P2 utilizando una reacción de formación de amida tal como las condiciones estándar de acoplamiento de péptidos arriba descritas. La eliminación del grupo de protección de ácido en (XIII), utilizando las cruces apropiadas para el grupo protector utilizado, seguido por acoplamiento con una ciclopropilsulfonamida (IV) como se ha descrito arriba, produce de nuevo el compuesto intermedio (XIV).

10 En una realización, L^1 es un grupo (b) y estas reacciones implican el acoplamiento de P1 a P2-P3, lo cual da como resultado los compuestos intermedios (X) o (II) arriba mencionados. En otra realización, L^1 es un grupo PG protector de N, que es como se ha especificado arriba, y la reacción de acoplamiento da como resultado un compuesto intermedio (XV-a) del cual puede separarse el grupo PG para dar compuestos intermedios (XIII-a), utilizando condiciones de reacción mencionadas también anteriormente:

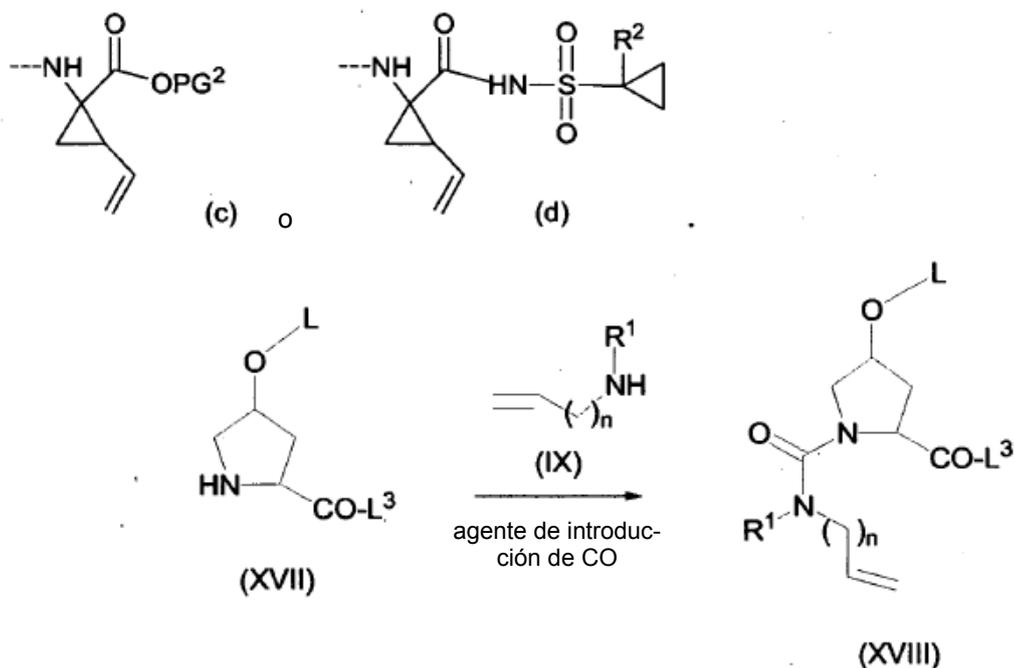


15 En una realización, PG en esta reacción es un grupo BOC. Cuando L^3 es adicionalmente hidrógeno, el material de partida es Boc-L-hidroxiprolina.

20 El grupo L^2 puede ser un grupo PG^1 protector de O que se introduce en el material de partida (XV), en donde L^2 es hidrógeno y que es escindible selectivamente para dar el grupo PG.

Acoplamiento de los bloques de construcción P3 y P2

25 Los bloques de construcción P3 y P2 se enlazan utilizando una reacción de formación de urea siguiendo los procedimientos arriba descritos para el acoplamiento de (VII) con (IX). Un procedimiento general se representa en el esquema de reacción siguiente donde L es como se ha especificado arriba y L^3 es un grupo $-O-PG^2$, o un grupo

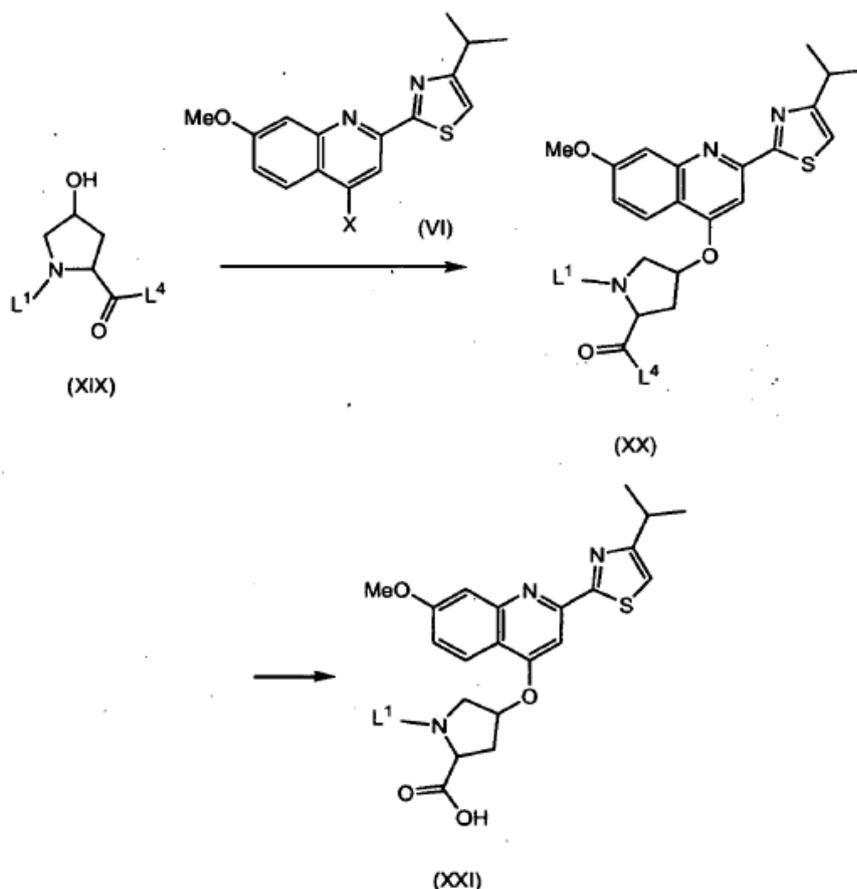


En (XVIII) R¹ es como se ha especificado arriba, pero puede ser adicionalmente un grupo protector de nitrógeno, que puede eliminarse con un agente de desprotección de nitrógeno en la etapa deseada de la ruta de síntesis. Cuando L³ en (XVIII) es un grupo -OPG², el grupo PG² puede eliminarse y el ácido resultante acoplarse con ciclopropil-aminoácidos (XVI-a) o (XVI-b), produciéndose los compuestos intermedios (XIII) o (XIV) en donde L¹ es un radical (b).

Los bloques de construcción P1, P1', P2 y P3 de los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar a partir de compuestos intermedios conocidos en la técnica. Cierta número de tales síntesis se describen más adelante con mayor detalle.

Síntesis de los bloques de construcción P2

Los bloques de construcción P2 se pueden preparar por una reacción de arilación en O, por ejemplo siguiendo los procedimientos arriba descritos, como se representa en el esquema siguiente, en donde L¹ es como se ha especificado arriba y en particular es un grupo PG protector de N, X es como se ha definido arriba y L⁴ es hidroxilo, un grupo -OPG², siendo PG² un grupo protector de carboxilo, tal como cualquiera de los grupos protectores de carboxilo mencionados anteriormente; o L⁴ es un grupo P1 tal como un grupo (c) o (d) como se ha definido arriba:

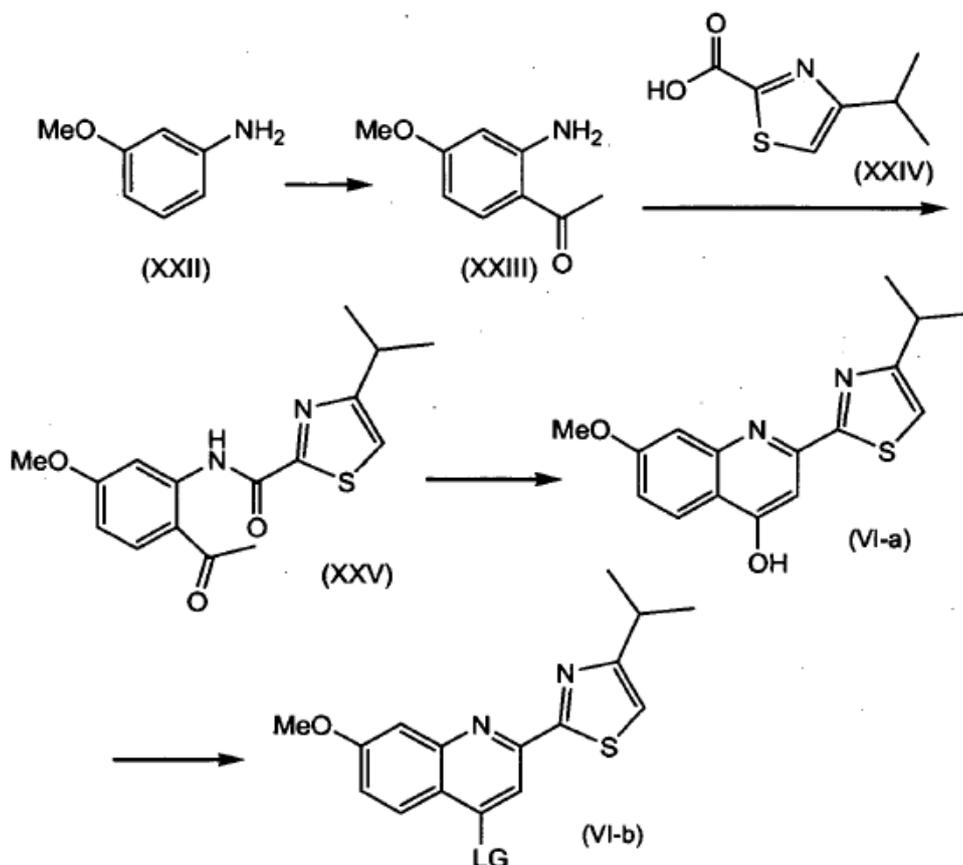


El material de partida (XIX) se hace reaccionar con el reactivo (VI) como se ha descrito arriba para la síntesis de (I-d) a partir de (V) y (VI). Análogamente a como se ha descrito arriba, esta reacción puede efectuarse con retención (arilación, siendo X un grupo lábil) o inversión (reacción de Mitsunobu) de la estereoquímica en el átomo de carbono que lleva el grupo hidroxilo. En la arilación en la que X es un grupo lábil, L⁴ puede ser también hidroxilo, y en la reacción de Mitsunobu L⁴ es un grupo -OPG².

En una realización, el grupo L¹ es PG, que es Boc y el material de partida (VIII) es Boc-L-hidroxiprolina disponible comercialmente, o cualquier otra forma estereoisómera del mismo.

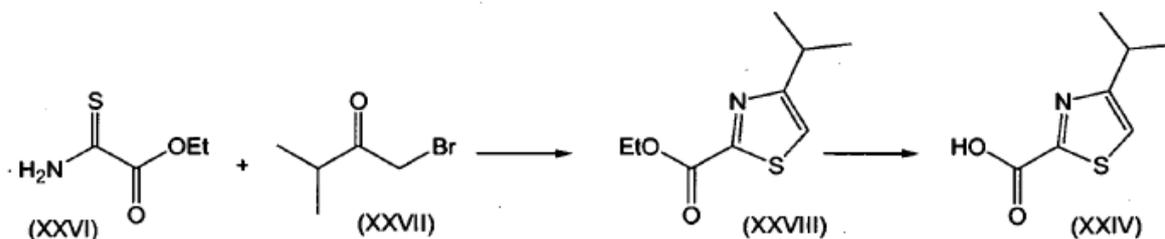
Cuando L⁴ en (XX) es -OPG², el grupo protector de carboxilo PG² puede eliminarse siguiendo procedimientos arriba descritos para los derivados de hidroxiprolina (XVII). En una realización, PG¹ es Boc y PG² es un alquiléster inferior, en particular un éster metílico o etílico. La hidrólisis del último éster para dar el ácido puede realizarse por procedimientos estándar, v.g. hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en metanol o etanol, o por un hidróxido metálico tal como hidróxido de sodio o, preferiblemente, hidróxido de litio.

Los compuestos intermedios (VI) se pueden preparar siguiendo métodos conocidos en la técnica con utilización de materiales de partida conocidos. Los mismos pueden prepararse como se muestra a continuación:

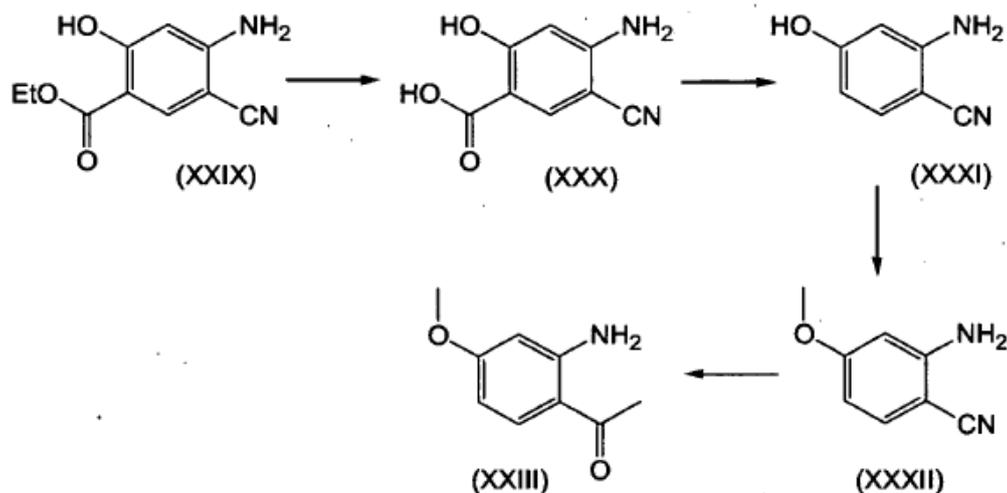


- La acilación Friedel-Crafts de una 3-metoxianilina (XXII), que está disponible comercialmente o por procedimientos conocidos en la técnica, utilizando un agente de acilación tal como cloruro de acetilo o análogos en presencia de uno o más ácidos de Lewis tales como tricloruro de boro y tricloruro de aluminio en un disolvente como diclorometano proporciona (XXIII). El acoplamiento de (XXIII) con ácido 4-isopropil-tiazol-2-carboxílico (XXIV), preferiblemente en condiciones básicas, por ejemplo en piridina, en presencia de un agente activador para el grupo carboxilato, por ejemplo POCl_3 , seguida por cierre de anillo y deshidratación en condiciones básicas como *tert*-butóxido de potasio en *tert*-butanol proporciona el derivado de quinoleína (VI-a). El último puede convertirse en (VI-b) en donde LG es un grupo lábil, v.g. por reacción de (XII) con un agente de halogenación, por ejemplo cloruro de fosforilo o análogos, o con un cloruro de arilsulfonilo, v.g. con cloruro de tosilo.

El 2-carboxi-4-isopropil-tiazol (XXIV) se sintetiza siguiendo procedimientos conocidos en la técnica, en particular como sigue:



- Se hace reaccionar tioacetato de etilo (XXVI) con la β -bromocetona (XXVII) para formar el éster del ácido tiazolil-carboxílico (XXVIII) que se hidroliza para dar el ácido correspondiente (XXIV). El éster etílico en estos compuestos intermedios puede reemplazarse por otros grupos protectores de carboxilo PG^2 , como se ha definido arriba.
- El compuesto intermedio (XXIII) se puede preparar también como ha sido descrito por Brown et al. J. Med. Chem. 1989, 32, 807-826, o como se reseña en el esquema siguiente:

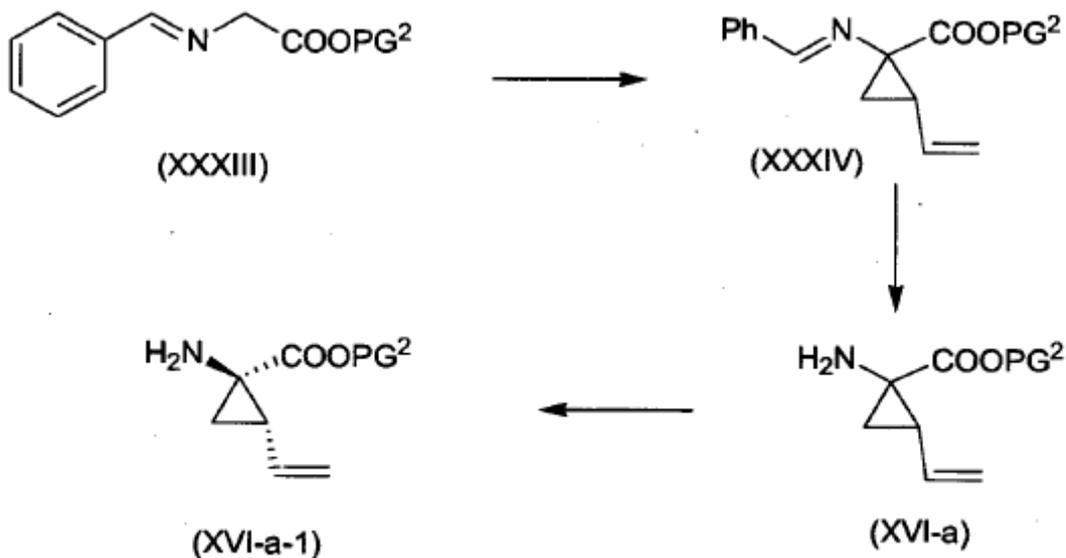


Los materiales de partida acetato de etilacetilo y etoximetileno-malononitrilo, que están disponibles comercialmente, se hacen reaccionar en presencia de una base adecuada, tal como etóxido de sodio, y un disolvente, tal como etanol y análogos. Esta reacción proporciona el compuesto intermedio (XXIX). El último se hidroliza, v.g. con una base tal como un hidróxido de metal alcalino, v.g. NaOH o LiOH, en un disolvente adecuado tal como etanol/agua para producir (XXX). La descarboxilación del compuesto intermedio (XXX) para dar el compuesto intermedio (XXXI) se realiza a temperatura incrementada hasta que cesa la efervescencia, preferiblemente en presencia de un disolvente básico tal como quinoleína. La metilación del compuesto intermedio (XXXI), en particular con un agente de metilación tal como MeI en presencia de una base adecuada (v.g. K₂CO₃) en un disolvente adecuado (tal como DMF y análogos) proporciona (XXXII). El último compuesto se hace reaccionar con un reactivo de Grignard tal como MeMgBr en presencia de un disolvente adecuado (v.g. THF), seguido por hidrólisis, por ejemplo con HCl acuoso, proporcionando el compuesto intermedio (XXXIII).

Síntesis de los Bloques de Construcción P1

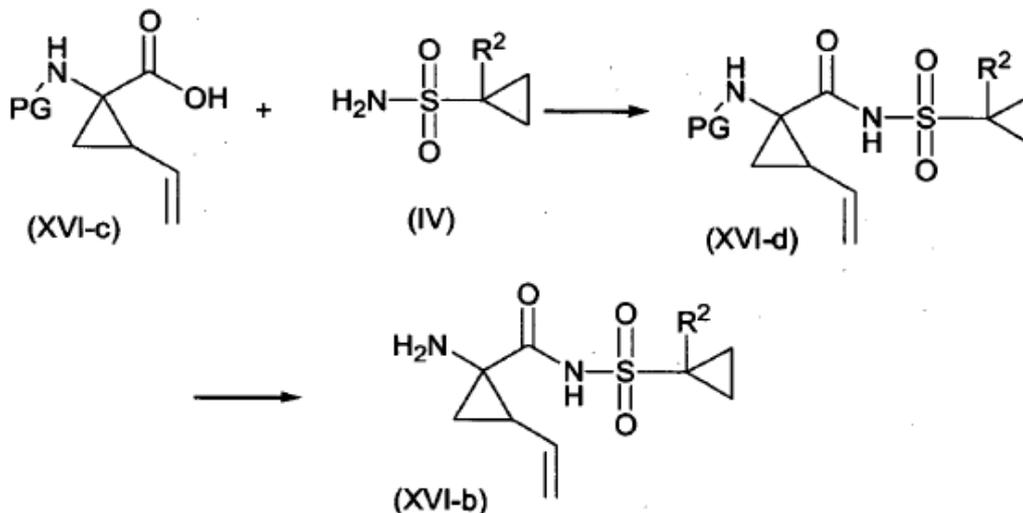
El ciclopropano-aminoácido utilizado en la preparación del fragmento P1 está disponible comercialmente o se puede preparar utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

El éster amino-vinil-ciclopropilético (XVI-a) puede obtenerse de acuerdo con el procedimiento descrito en WO 00/09543 o como se ilustra en el esquema siguiente, en donde PG² es un grupo protector de carboxilo como se ha especificado arriba:



El tratamiento de la imina disponible comercialmente u obtenible fácilmente (XXXIII) con 1,4-dihalobuteno en presencia de una base produce (XXXIV) que, después de hidrólisis, proporciona el ciclopropilaminoácido (XVI-a), que tiene el sustituyente alilo en configuración *syn* respecto al grupo carboxilo. La resolución de la mezcla enantiomérica (XVI-a) da como resultado (XVI-a-1). La resolución se realiza utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como separación enzimática; cristalización con un ácido quiral; o derivatización química; o por cromatografía quiral en columna.

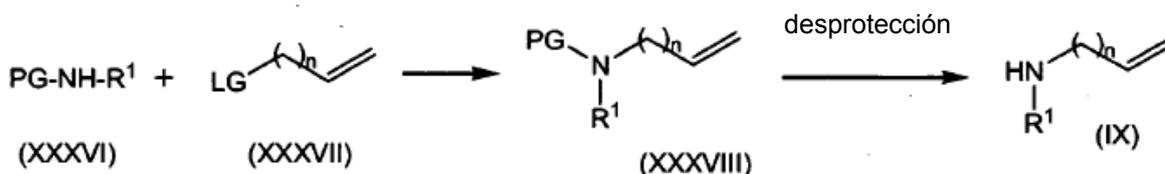
El derivado de sulfonamida (XVI-b) puede obtenerse como se resume en el esquema de reacción siguiente, en donde R^2 y PG son como se ha especificado arriba:



La reacción de (XVI-c) con sulfonamida (IV) es un procedimiento de formación de amidas, que puede realizarse siguiendo los procedimientos arriba descritos. Esta reacción proporciona los compuestos intermedios (XVI-d) de los cuales se elimina el grupo protector de amino por métodos estándar tales como los arriba descritos. Esto da como resultado a su vez el compuesto intermedio deseado (XVI-b). Los materiales de partida (XVI-c) se pueden preparar a partir de los compuestos intermedios (XVI-a) por introducción primeramente de un grupo PG protector de N y eliminación subsiguiente del grupo PG^2 .

Síntesis de los bloques de construcción P3

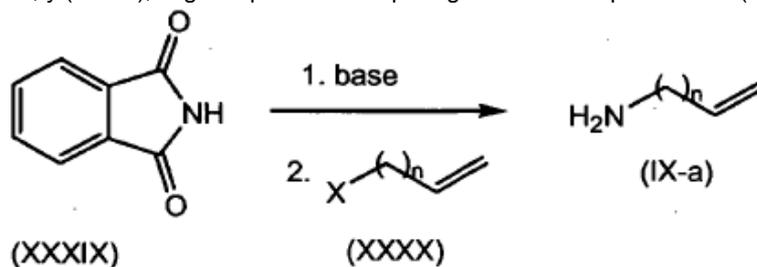
Los bloques de construcción P3 (IX) se pueden preparar de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica. Una de estas metodologías se muestra en el esquema siguiente y parte de aminas protegidas (XXXVI), en particular de aminas monoaciladas, tales como trifluoroacetamida, o a partir de una amina protegida con Boc:



En este esquema, LG es un grupo protector de N como se ha especificado arriba y en particular es BOC o trifluoroacetilo; R^1 y n son como se ha definido arriba, y en donde R^1 puede ser también un grupo adicional protector de nitrógeno que puede escindirse selectivamente para dar el grupo PG. LG es un grupo lábil como se ha especificado arriba, siendo particularmente LG cloro o bromo. Donde R^1 representa un grupo protector de nitrógeno, el mismo puede eliminarse con un agente de desprotección de nitrógeno en la etapa deseada de la ruta de síntesis.

Las aminas monoalquiladas (XXXVI) se tratan con una base fuerte tal como hidruro de sodio y se hacen reaccionar subsiguientemente con un halo C_{3-8} alqueno (XXXVII) para dar la amina protegida correspondiente (XXXVIII). La desprotección de (XXXVIII) proporciona (IX). La desprotección dependerá del grupo PG, así, si PG es Boc, la desprotección puede realizarse con un ácido relativamente débil, v.g. ácido trifluoroacético, o cuando PG es trifluoroacetilo, con una base, v.g. hidróxido de sodio.

Los compuestos intermedios (IX) en los que R^1 es hidrógeno, se pueden preparar también por una síntesis de Gabriel de una alquenilamina, que puede llevarse a cabo por el tratamiento de una ftalimida (XXXIX) con una base, tal como hidróxido de potasio, y (XXXX), seguido por hidrólisis para generar una alquenilamina (IX-a):



En el esquema anterior, LG es halógeno, y n es como se define arriba.

Los compuestos de fórmula (I) pueden convertirse en las formas de *N*-óxido correspondientes siguiendo procedimientos conocidos en la técnica para convertir un nitrógeno trivalente en su forma de *N*-óxido. Dicha reacción de oxidación en *N* puede llevarse a cabo generalmente por reacción del material de partida de fórmula (I) con un peróxido apropiado orgánico o inorgánico. Peróxidos inorgánicos apropiados comprenden, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, peróxidos de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, v.g. peróxido de sodio, peróxido de potasio; peróxidos orgánicos apropiados pueden comprender peroxiácidos tales como, por ejemplo, ácido bencenocarboperoxoico o ácido bencenocarboperoxoico halo-sustituido, v.g. ácido 3-clorobencenocarboperoxoico, ácidos peroxoalcanoicos, v.g. ácido peroxoacético, hidroperóxidos de alquilo, v.g. hidroperóxido de *tert*-butilo. Disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, alcoholes inferiores, v.g. etanol y análogos, hidrocarburos, v.g. tolueno, cetonas, v.g. 2-butanona, hidrocarburos halogenados, v.g. diclorometano, y mezclas de tales disolventes.

Las formas estereoquímicamente isómeras puras de los compuestos de fórmula (I) se pueden obtener por la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Los diastereómeros pueden separarse por métodos físicos tales como cristalización selectiva y técnicas cromatográficas, v.g., distribución en contracorriente, cromatografía líquida y análogos.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse como mezclas racémicas de enantiómeros que pueden separarse unos de otros siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) que son suficientemente básicos o ácidos, pueden convertirse en las correspondientes formas de sal diastereoméricas por reacción con un ácido quiral adecuado, o respectivamente una base quiral. Dichas formas de sal diastereoméricas se separan subsiguientemente, por ejemplo, por cristalización selectiva o fraccionada y los enantiómeros se liberan de ellas por álcali o ácido. Una manera alternativa de separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía líquida, en particular cromatografía líquida utilizando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras pueden derivarse también de las formas estereoquímicamente isómeras puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, con la condición de que la reacción transcurre estereoespecíficamente. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto puede sintetizarse por métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos pueden emplear ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se especifica en esta memoria, o un compuesto de cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) como se especifican en esta memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente para actuar profilácticamente contra, estabilizar o reducir una infección viral, y en particular infección por el virus HCV, en individuos infectados o individuos que se encuentran en riesgo de ser infectados. En otro aspecto adicional, esta invención se refiere a un proceso de preparación de una composición farmacéutica como se especifica en esta memoria, que comprende mezclar íntimamente un vehículo farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), como se especifica en esta memoria, o de un compuesto de cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I) como se especifican en esta memoria.

Por consiguiente, los compuestos de la presente invención o cualquier subgrupo de los mismos pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para propósitos de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones empleadas usualmente para administración sistémica de fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición o complejo metálico, como el ingrediente activo, se combina en mixtura íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosis unitaria adecuada, particularmente, para administración por vía oral, rectal, percutánea, o por inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, pueden emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y análogos en el caso de preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes de desintegración y análogos en el caso de polvos, píldoras, cápsulas, y tabletas. Debido a su facilidad de administración, tabletas y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso pueden emplearse obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros ingredientes, por ejemplo, para favorecer la solubilidad. Pueden prepararse por ejemplo soluciones inyectables, en las cuales el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mixtura de solución salina y solución de glucosa. Pueden prepararse también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de suspensión y análogos apropiados. Se incluyen asimismo preparaciones de forma sólida que tienen por objeto convertirse, poco tiempo antes de su utilización, en preparaciones de forma líquida. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinados opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en menores proporciones, aditivos que no introducen un efecto deletéreo importante en la piel.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse también por inhalación oral o insuflación por medio de métodos y formulaciones empleadas en la técnica para administración por esta vía. Así, en general, los compuestos de la presente invención pueden administrarse a los pulmones en la forma de una solución, una suspensión o un polvo seco, prefiriéndose una solución. Cualesquiera sistemas desarrollados para el suministro de soluciones, suspensiones o polvos secos por inhalación oral o insuflación son adecuados para la administración de los presentes compuestos.

Así pues, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica adaptada para administración por inhalación o insuflación a través de la boca que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por inhalación de una solución en dosis nebulizadas o aerosolizadas.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria tal como se utiliza en esta memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son tabletas (con inclusión de tabletas ranuradas o recubiertas), cápsulas, píldoras, supositorios, paquetes de polvos, pastillas, soluciones o suspensiones inyectables, y múltiples segregados de las mismas.

Los compuestos de fórmula (I) exhiben propiedades antivirales. Infecciones virales y sus enfermedades asociadas que pueden tratarse con los compuestos y métodos de la presente invención incluyen aquellas infecciones causadas por HCV y otros flavivirus patógenos tales como la fiebre Amarilla, la fiebre del Dengue (tipos 1-4), la encefalitis de St. Louis, la encefalitis Japonesa, la encefalitis del valle de Murray, el virus del Nilo Occidental y el virus Kunjin. Las enfermedades asociadas con HCV incluyen fibrosis, inflamación y necrosis hepática progresivas que conducen a cirrosis, enfermedad hepática de fase final, y HCC; y para los otros flavivirus patógenos las enfermedades incluyen fiebre Amarilla, fiebre del Dengue, fiebre hemorrágica y encefalitis. Algunos de los compuestos de esta invención son además activos contra cepas mutadas de HCV. Adicionalmente, muchos de los compuestos de esta invención exhiben un perfil farmacocinético favorable y tienen propiedades atractivas en términos de biodisponibilidad, con

inclusión de una semi-vida, AUC (área bajo la curva), y valores pico aceptables, y carencia de fenómenos desfavorables tales como comienzo rápido insuficiente y retención tisular.

5 La actividad antiviral *in vitro* contra HCV de los compuestos de fórmula (I) se testó en un sistema celular de replicones del HCV basado en Lohmann et al. (1999) Science 285: 110-113, con las modificaciones adicionales descritas por Krieger et al. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, que se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos. Este modelo, si bien no es un modelo completo de infección para HCV, está aceptado generalmente como el modelo más robusto y eficiente de replicación autónoma del RNA de HCV disponible actualmente. Los compuestos que exhiben actividad anti-HCV en este modelo celular se consideran como candidatos para desarrollo adicional en el tratamiento de las infecciones por HCV en los mamíferos. Se apreciará que es importante distinguir entre compuestos que interfieren específicamente con las funciones del HCV de aquéllos que ejercen efectos citotóxicos o citostáticos en el modelo de replicones del HCV, y como consecuencia causan una disminución en la concentración de RNA de HCV o de enzimas informadoras ligadas. Se conocen ensayos en este campo para la evaluación de la citotoxicidad celular basados por ejemplo en la actividad de enzimas mitocondriales utilizando tintes fluorógenos redox tales como resazurina. Adicionalmente, existen filtros contadores de células para la evaluación de la inhibición no selectiva de la actividad de genes informadores ligados, tales como la luciferasa de luciérnaga. Tipos de células apropiados pueden equiparse por transfección estable con un gen informador de luciferasa cuya expresión es dependiente de un promotor génico constitutivamente activo, y tales células pueden utilizarse como contrafiltro para eliminar los inhibidores no selectivos.

20 Debido a sus propiedades antivirales, particularmente sus propiedades anti-HCV, los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de los mismos, sus *N*-óxidos, sales de adición, aminas cuaternarias, complejos metálicos y formas estereoquímicamente isómeras, son útiles en el tratamiento de individuos que sufren una infección viral, particularmente una infección por HCV, y para la profilaxis de estas infecciones. En general, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de animales de sangre caliente infectados con virus, en particular flavivirus tales como HCV.

25 Los compuestos de la presente invención o cualquier subgrupo de los mismos pueden utilizarse por tanto como medicamentos. Dicho uso como medicamento o método de tratamiento comprende la administración sistémica a los individuos infectados por virus o a individuos propensos a infecciones virales de una cantidad eficaz para combatir las condiciones asociadas con la infección viral, en particular la infección por HCV.

30 La presente invención se refiere también al uso de los presentes compuestos o cualquier subgrupo de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infecciones virales, particularmente infección por HCV.

35 La presente divulgación se refiere adicionalmente a un método de tratamiento de un animal de sangre caliente infectado por un virus, o que se encuentra en riesgo de verse infectado por un virus, en particular por HCV, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad anti-viral eficaz de un compuesto de fórmula (I), como se especifica en esta memoria, o de un compuesto de cualquiera de los subgrupos de compuestos de fórmula (I), como se especifican en esta memoria.

40 Asimismo, la combinación de un compuesto anti-HCV previamente conocido, tal como, por ejemplo, interferón- α (IFN- α), interferón- α pegilado y/o ribavirina, y un compuesto de fórmula (I) puede utilizarse como medicamento en una terapia de combinación. El término "terapia de combinación" se refiere a un producto que contiene obligatoriamente (a) un compuesto de fórmula (I), y (b) opcionalmente otro compuesto anti-HCV, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones de HCV, en particular, el tratamiento de las infecciones de HCV.

45 Los compuestos anti-HCV abarcan agentes seleccionados de un inhibidor de la polimerasa de HCV, un inhibidor de la proteasa de HCV, un inhibidor de otra diana en el ciclo vital del HCV, y un agente inmunomodulador, un agente antiviral, y combinaciones de los mismos.

50 Los inhibidores de la HCV-polimerasa incluyen, pero sin carácter limitante, NM283 (valopicitabina), R803, JTK-109, JTK-003, HCV-371, HCV-086, HCV-796 y R-1479.

55 Los inhibidores de las proteasas de HCV (inhibidores NS2-NS3 e inhibidores NS3-NS4A) incluyen, pero sin carácter limitante, los compuestos de WO 02/18369 (véase, v.g. página 273, líneas 9-22 y página 274, línea 4 a página 276, línea 11); BILN-2061, VX-950, GS-9132 (ACH-806), SCH-503034, y SCH-6. Agentes adicionales que pueden utilizarse son los descritos en WO-98/17679, WO-00/056331 (Vertex); WO 98/22496 (Roche); WO 99/07734, (Boehringer Ingelheim J, WO 2005/073216, WO2005073195 (Medivir) y agentes estructuralmente similares.

60 Inhibidores de otras dianas en el ciclo vital del HCV incluyen la helicasa NS3; inhibidores de metaloproteasas; inhibidores oligonucleotídicos antisentido, tales como ISIS-14803, AVI-4065 y análogos; siRNA's tales como SIRPLEX-140-N y análogos; RNA de horquilla corta codificado por vector (shRNA); DNAsimas; ribozimas específicas del HCV

tales como heptazima, RPI.13919 y análogos; inhibidores de entrada tales como HepeX-C, HuMax-HepC y análogos; inhibidores de alfa-glucosidasas tales como celgosivir, UT-231B y análogos; KPE-02003002; y BIVN 401.

5 Agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin carácter limitante: compuestos de isoformas de interferón naturales y recombinantes, con inclusión de α -interferón, β -interferón, γ -interferón, ω -interferón y análogos, tales como Intron A®, Roferon-A®, Canferon-A300®, Advaferon®, Infergen®, Humoferon®, Sumiferon MP®, Alfaferone®, IFN-beta®, Feron® y análogos; compuestos de interferón derivados con polietilenglicol (pegilados), tales como PEG-interferón- α -2a (Pegasys®), PEG-interferón- α -2b (PG-Intron®), IFN- α -con1 pegilado y análogos; formulaciones de acción prolongada y derivatizaciones de compuestos de interferón tales como el interferón-albuferón α fusionado con albúmina y análogos; compuestos que estimulan la síntesis de interferón en las células, tales como resiquimod y análogos; interleuquinas; compuestos que mejoran el desarrollo de la respuesta de las células T adyuvantes tipo 1, tales como SCV-07 y análogos; agonistas de los receptores de tipo PEAJE tales como CpG-10101 (actilón), isatoribina y análogos; timosina- α -1; ANA-245; ANA-246; dihidrocloruro de histamina; propagermanio; tetraclorodecaóxido; ampligén; IMP-321; KRN-7000; anticuerpos, tales como civacir, XTL-6865 y análogos; y vacunas profilácticas y terapéuticas tales como InnoVac C, HCV E1E2/MF59 y análogos.

Otros agentes antivirales incluyen, pero sin carácter limitante, ribavirina, amantadina, viramidina, nitazoxamida; telbivudina; NOV-205; taribavirina; inhibidores de la entrada de ribosomas internos; inhibidores virales de amplio espectro, tales como inhibidores IMPDH (v.g., compuestos de US5.807.876, US6.498.178, US6.344.465, US6.054.472, WO97/40028, WO98/40381, WO00/56331 y ácido micofenólico y derivados del mismo, con inclusión, pero sin carácter limitante, de VX-950, merimepodib (VX-497), VX-148, y/o VX-944); o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

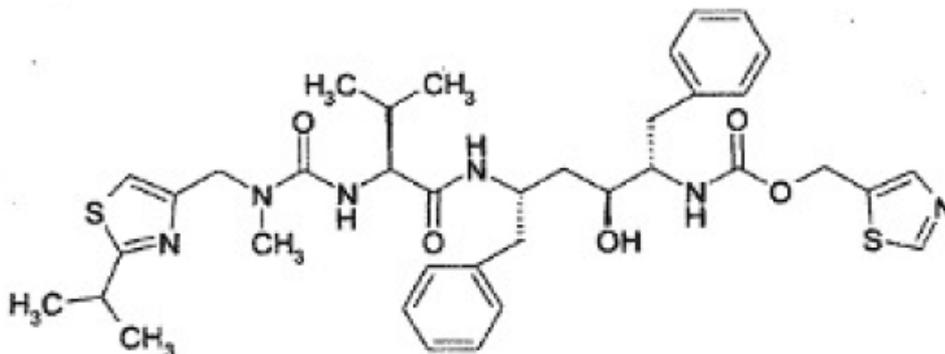
25 Así, para combatir o tratar las infecciones de HCV, los compuestos de fórmula (I) pueden co-administrarse en combinación con, por ejemplo, interferón- α (IFN- α), interferón- α pegilado y/o ribavirina, así como agentes terapéuticos basados en anticuerpos direccionados contra epítopes de HCV, RNA interferente pequeño (Si RNA), ribozimas, DNazimas, RNA antisentido, antagonistas de moléculas pequeñas de, por ejemplo, la proteasa NS3, la helicasa NS3 y la polimerasa NS5B.

30 De acuerdo con ello, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o cualquier subgrupo del mismo como se define arriba para la fabricación de un medicamento útil para inhibir la actividad de HCV en un mamífero infectado con virus HCV, en donde dicho medicamento se utiliza en una terapia de combinación, comprendiendo preferiblemente dicha terapia de combinación un compuesto de fórmula (I) y otro compuesto inhibidor de HCV, v.g. IFN- α (pegilado) y/o ribavirina.

35 En otro aspecto adicional, se proporcionan combinaciones de un compuesto de fórmula (I) como se especifica en esta memoria y un compuesto anti-HCV. Los últimos son preferiblemente aquellos inhibidores de HIV que tienen un efecto positivo sobre el metabolismo y/o la farmacocinética de los fármacos que mejoran la biodisponibilidad. Un ejemplo de un inhibidor de HIV de este tipo es ritonavir.

40 Como tal, la presente invención proporciona adicionalmente una combinación que comprende (a) un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 El compuesto ritonavir, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y métodos para su preparación se describen en WO94/14436. Para formas de dosificación preferidas de ritonavir, véase US6.037.157, y los documentos citados en el mismo; US5.484.801, US08/402.690, y WO95/07696 y WO95/09614. ritonavir tiene la fórmula siguiente:



50 En una realización adicional, la combinación que comprende (a) un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable

del mismo, comprende adicionalmente un compuesto anti-HCV adicional seleccionado de los compuestos que se describen en esta memoria.

5 En una realización de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar una combinación como se describe en esta memoria, que comprende el paso de combinar un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una realización alternativa de esta invención proporciona un proceso en el cual la combinación comprende uno o más agentes adicionales como se describen en esta memoria.

10 Las combinaciones de la presente invención pueden utilizarse como medicamentos. Dicha utilización como medicamento o método de tratamiento comprende la administración sistémica a individuos infectados por HCV de una cantidad eficaz para combatir las condiciones asociadas con HCV y otros flavi- y pestivirus patógenos. Por consiguiente, las combinaciones de la presente invención pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento útil para tratar, prevenir o combatir una infección o enfermedad asociada con infección por HCV en un mamífero, en particular para
15 tratar condiciones asociadas con HCV y otros flavi- y pestivirus patógenos.

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición farmacéutica comprende además un agente adicional seleccionado de un inhibidor de la polimerasa de HCV, un inhibidor de la proteasa de HCV, un inhibidor de otra diana en el ciclo vital del HCV, y un agente inmunomodulador, un agente antiviral, y combinaciones de los mismos.
20
25

Las composiciones pueden formularse en formas de dosificación farmacéutica adecuadas tales como las formas de dosificación descritas anteriormente. Cada uno de los ingredientes activos puede formularse por separado y las formulaciones pueden co-administrarse o puede proporcionarse una formulación que contiene ambos y, en caso deseado, otros ingredientes activos.
30

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "composición" abarca un producto que comprende los ingredientes especificados, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados.
35

En una realización, las combinaciones proporcionadas en esta memoria pueden formularse también como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia del HIV. En dicho caso, el compuesto de fórmula general (I) o cualquier subgrupo de los mismos, se formula en una composición farmacéutica que contiene otros excipientes farmacéuticamente aceptables, y el ritonavir se formula por separado en una composición farmacéutica que contiene otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Convenientemente, estas dos composiciones farmacéuticas separadas pueden formar parte de un kit para uso simultáneo, separado o secuencial.
40

Así, los componentes individuales de la combinación de la presente invención pueden administrarse por separado, en momentos diferentes durante el curso de la terapia o al mismo tiempo en formas de combinación divididas o simples. Por consiguiente, debe entenderse que la presente invención abarca la totalidad de dichos regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término "administración" debe interpretarse de acuerdo con ello. En una realización preferida, las formas de dosificación separadas se administran aproximadamente al mismo tiempo.
45

En una realización, la combinación de la presente invención contiene una cantidad de ritonavir, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es suficiente para mejorar clínicamente la biodisponibilidad del inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) con relación a la biodisponibilidad cuando dicho inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) se administra solo.
50

En otra realización, la combinación de la presente invención contiene una cantidad de ritonavir, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es suficiente para mejorar al menos una de las variables farmacocinéticas del inhibidor de la proteasa NS3/4a del HCV de fórmula (I) seleccionada de $t_{1/2}$, C_{min} , C_{max} , C_{ss} , AUC a las 12 horas, o AUC a las 24 horas, con relación a dicha al menos una variable farmacocinética cuando el inhibidor de la proteasa NS3/4a del HCV de fórmula (I) se administra solo.
55

Una realización adicional de la divulgación se refiere a un método para mejorar la biodisponibilidad de un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV que comprende administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de dicha mejora una combinación como se define en esta memoria, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cada componente de dicha combinación.
60

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un mejorador de al menos una de las variables farmacocinéticas de un inhibidor de la proteasa NS3/4a
65

de HCV de fórmula (I) seleccionada de $t_{1/2}$, C_{min} , C_{max} , C_{ss} , AUC a las 12 horas, o AUC a las 24 horas; con la salvedad de que dicho uso no se realiza en el cuerpo humano o animal.

5 El término "individual", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, muy preferiblemente un humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

10 La biodisponibilidad se define como la fracción de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica. $t_{1/2}$ representa la semi-vida o tiempo requerido para que la concentración en plasma descienda a la mitad de su valor original. C_{ss} es la concentración en estado estacionario, es decir la concentración para la cual la tasa de entrada de fármaco es igual a la tasa de eliminación. C_{min} se define como la concentración más baja (mínima) medida durante el intervalo de dosificación. C_{max} representa la concentración más alta (máxima) medida durante el intervalo de dosificación. AUC se define como el área bajo la curva concentración en plasma-tiempo durante un periodo de tiempo definido.

15 Las combinaciones de esta invención pueden administrarse a humanos en intervalos de dosificación específicos para cada componente comprendido en dichas combinaciones. Los componentes comprendidos en dichas combinaciones pueden administrarse juntos o por separado. Los inhibidores de la proteasa NS3/4a de fórmula (I) o cualquier subgrupo de los mismos, y ritonavir o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable, pueden tener niveles de dosificación del orden de 0,02 a 5,0 gramos por día.

20 Cuando el inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) y ritonavir se administran en combinación, la ratio en peso del inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) a ritonavir está comprendida convenientemente en el intervalo de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 1:15, o desde aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:15, o desde aproximadamente 15:1 a aproximadamente 1:15, como valor típico desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, y de modo más típico desde aproximadamente 8:1 a aproximadamente 1:8. Son útiles también ratios en peso de los inhibidores de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) a ritonavir comprendidas entre aproximadamente 6:1 y aproximadamente 1:6, desde aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, o desde aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3, o desde aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, o desde aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 1:1,5. En un aspecto, la cantidad en peso de los inhibidores de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) es igual a o mayor que la de ritonavir, estando comprendida convenientemente la ratio en peso del inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) a ritonavir en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 15:1, como valor típico desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10, y como valor más típico desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 8:1. Son útiles también ratios en peso del inhibidor de la proteasa NS3/4a de CV de fórmula (I) a ritonavir que van desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 6:1, o desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, o desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1, o desde aproximadamente 3:2 a aproximadamente 3:1, o desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1 o desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1.

40 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en esta memoria, significa aquella cantidad de compuesto o componente o agente farmacéutico activo que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o humano que es buscada, en el contexto de la presente invención, por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad que se esté tratando. Dado que la presente invención se refiere a combinaciones que comprenden dos o más agentes, la "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella cantidad de los agentes considerados juntos tal que el efecto combinado provoca la respuesta biológica o medicinal deseada. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) el compuesto de fórmula (I) y (b) ritonavir, sería aquella cantidad del compuesto de fórmula (I) y la cantidad de ritonavir que, cuando se administran juntas, tienen un efecto combinado que es terapéuticamente eficaz.

50 En general, se contempla que una cantidad antiviral diaria eficaz sería de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como una, dos, tres, cuatro o más (sub)dosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis pueden formularse como formas de dosificación unitaria, por ejemplo, conteniendo 1 a 1000 mg, y en particular 5 a 200 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

55 La dosificación y frecuencia exactas de administración dependen del compuesto particular de fórmula (I) utilizado, la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, la edad, el peso, el sexo, la magnitud del trastorno y el estado físico general del paciente particular, así como de otra medicación que pueda estar tomando el individuo, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Adicionalmente, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede reducirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del individuo tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de la presente invención. Los intervalos de cantidad diaria eficaz mencionados anteriormente en esta memoria son por tanto sólo líneas orientativas.

60 De acuerdo con una realización, el inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) y ritonavir pueden administrarse una o dos veces al día, preferentemente por vía oral, siendo la cantidad de los compuestos de fórmula (I) por dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 2500 mg, y siendo la cantidad de ritonavir por dosis es de 1 a aproximadamente 2500 mg. En otra realización, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces

al día son de aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 mg del compuesto de fórmula (I) y de aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 mg de ritonavir. En otra realización adicional, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces al día son desde aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 mg del compuesto de fórmula (I) y desde aproximadamente 100 a aproximadamente 800 mg de ritonavir. En otra realización adicional, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces al día son de aproximadamente 150 a aproximadamente 800 mg del compuesto de fórmula (I) y de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 mg de ritonavir. En otra realización adicional, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces al día son de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 mg del compuesto de fórmula (I) y desde aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg de ritonavir. En otra realización adicional, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces al día son desde aproximadamente 200 a aproximadamente 600 mg del compuesto de fórmula (I) y desde aproximadamente 20 a aproximadamente 300 mg de ritonavir. En otra realización adicional, las cantidades por dosis para co-administración una o dos veces al día son desde aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg del compuesto de fórmula (I) y desde aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mg de ritonavir.

Combinaciones ilustrativas del compuesto de fórmula (I) (mg)/ritonavir (mg) para dosificación una o dos veces al día incluyen 50/100, 100/100, 150/100, 200/100, 250/100, 300/100, 350/100, 400/100, 450/100, 50/133, 100/133, 150/133, 200/133, 250/133, 300/133, 50/150, 100/150, 150/150, 200/150, 250/150, 50/200, 100/200, 150/200, 200/200, 250/200, 300/200, 50/300, 80/300, 150/300, 200/300, 250/300, 300/300, 200/600, 400/600, 600/600, 800/600, 1000/600, 200/666, 400/666, 600/666, 800/666, 1000/666, 1200/666, 200/800, 400/800, 600/800, 800/800, 1000/800, 1200/800, 200/1200, 400/1200, 600/1200, 800/1200, 1000/1200, y 1200/1200. Otras combinaciones ilustrativas del compuesto de fórmula (I) (mg)/ritonavir (mg) para dosificación una o dos veces al día incluyen 1200/400, 800/400, 600/400, 400/200, 600/200, 600/100, 500/100, 400/50, 300/50, y 200/50.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición eficaz para tratar una infección de HCV o para inhibir la proteasa NS3 de HCV; y material de empaquetamiento que comprende una etiqueta que indica que la composición puede utilizarse para tratar infección por el virus de la hepatitis C; en donde la composición comprende un compuesto de la fórmula (I) o cualquier subgrupo del mismo, o la combinación que se describe en esta memoria.

Otra realización de la presente divulgación concierne a un kit o envase que comprende un compuesto de fórmula (I) o cualquier subgrupo de la misma, o una combinación de acuerdo con la invención que combina un inhibidor de la proteasa NS3/4a de HCV de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para utilización como un estándar o reactivo en un test o ensayo para determinación de la capacidad de productos farmacéuticos potenciales para inhibir la proteasa NS3/4a de HCV, el crecimiento de HCV, o ambas cosas. Este aspecto de la invención puede encontrar su utilización en programas de investigación farmacéutica.

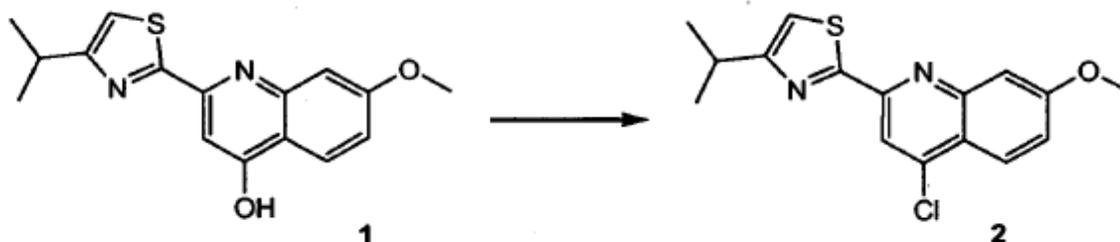
Los compuestos y combinaciones de la presente invención pueden utilizarse en ensayos de analitos diana de alta capacidad tales como los destinados a medir la eficacia de dicha combinación en el tratamiento del HCV.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen tienen por objeto ilustrar la presente invención y no limitar la invención a los mismos.

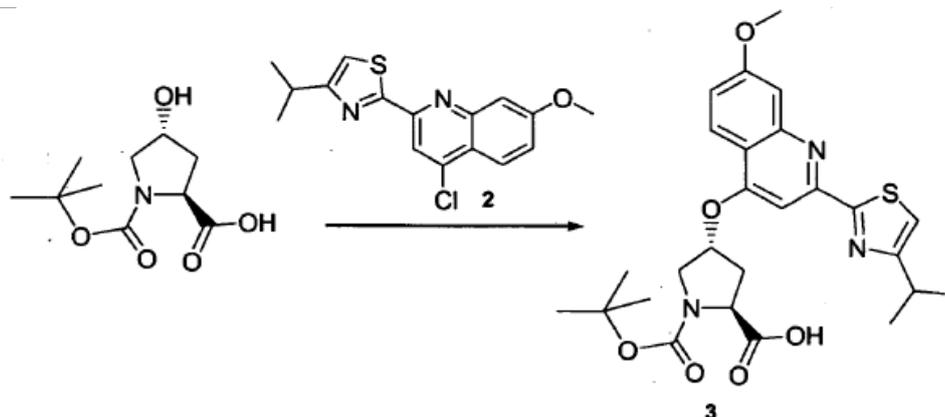
Ejemplo 1: Preparación de *N*-[18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-il-oxi]-2,15-dioxo-3,14,16-triazatriciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-(ciclopropil)sulfonamida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (9) a continuación:

Paso A



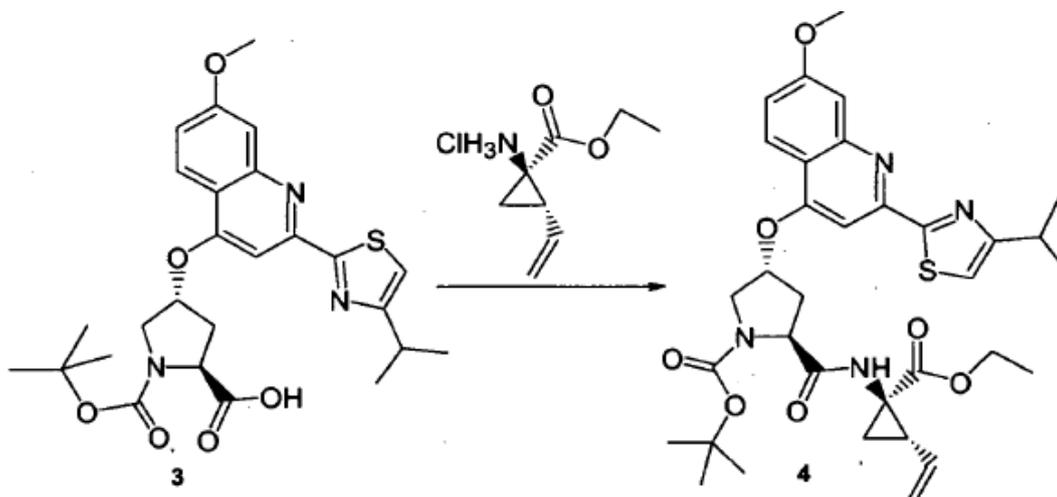
Una solución de 2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-ol (**1**, 3,6 g) en oxiclورو de fósforo (20 ml) se calentó a 100°C durante 40 minutos (la reacción se monitorizó por LC-MS). A continuación, se enfrió la reacción a la temperatura ambiente y se evaporó el exceso de oxiclورو de fósforo. El aceite residual se repartió entre una solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con dietiléter (3 × 70 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se concentraron por evaporación rotativa y se pasaron a través de un taco corto de sílice (hexanos) para dar 3,6 g (62%) del producto deseado **2** como un polvo blanco.

Paso B



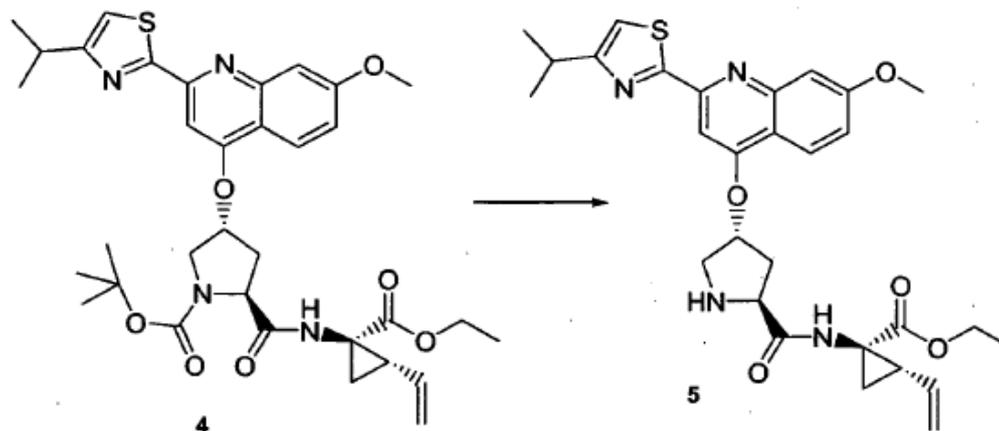
5 A una solución agitada de Boc-4-hidroxirolina, con la estereoquímica específica que se ilustra en la fórmula anterior, (2,6 g, 11,2 mmol) en DMSO (80 ml) se añadió *tert*-butóxido de potasio (3,8 g, 3 eq). Después de aproximadamente 1 hora de agitación, se añadió 4-cloro-2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxi-quinoleína (**2**, 3,6 g 11,2 mmol) y la mixtura de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. A continuación, se diluyó la mixtura de reacción con agua (350 ml) y se neutralizó con HCl 1N. La suspensión resultante se extrajo en acetato de etilo (3 × 100 ml), se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. La filtración y concentración por evaporación rotativa dieron, después de secado durante una noche a alto vacío, 3,6 g (62%) del producto deseado **3**: Pureza por HPLC >95%, *m/z* = 514 (M+H)⁺.

Paso C



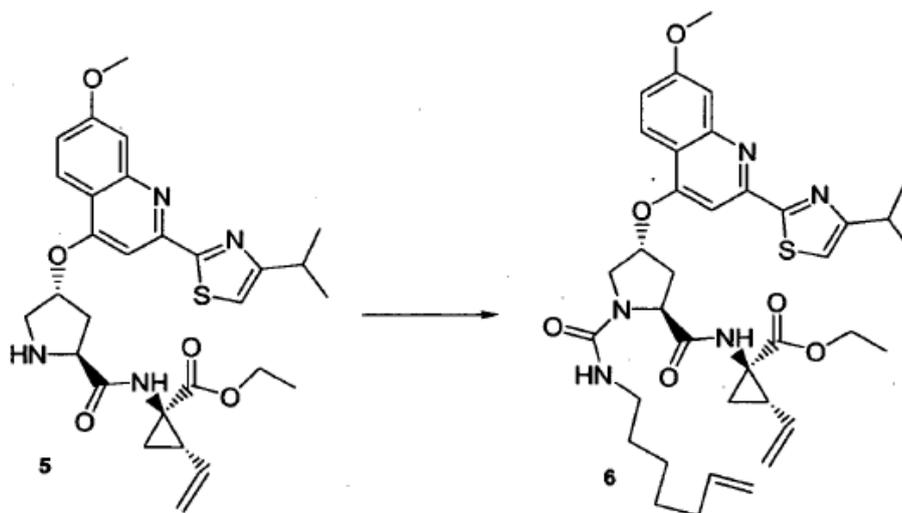
15 El ácido **3** (3,6 g, 7 mmol) se mezcló con el hidrocloreto del éster etílico del ácido 1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico, con la estereoquímica específica que se ilustra en la fórmula anterior (1,47 g, 7,6 mmol), y se disolvió luego en DMF. La mixtura de reacción se lavó concienzudamente con argón, se enfrió en un baño de hielo y se añadió DIPEA (1,5 ml) en una sola porción. A continuación, se agitó la mixtura de reacción durante 10-15 min a 0°C, antes de añadir HATU (2,93 g, 7,7 mmol) a 0°C bajo argón, en una sola porción. Después de 40 min a 0°C (la reacción se monitorizó por LC-MS), la mixtura de reacción se concentró por evaporación rotativa (no hasta sequedad completa), se mezcló luego con una solución de NaHCO₃ saturado y se extrajo en EtOAc (3 × 100 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró por evaporación rotativa. La purificación por cromatografía en columna sobre sílice (DCM) y luego sobre sílice YMC (200 g, gradiente de hexanos/EA 3:2 a 2:3) proporcionó 3,81 g (84%) del producto diana **4** como un polvo blanco.

Paso D



5 Una solución de **4** (3,81 g, 5,8 mmol) en CH_2Cl_2 (30 ml) y ácido trifluoroacético (30 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se repartió entre NaHCO_3 saturado (100 ml) y dietiléter (3×100 ml). Las capas de dietiléter se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se evaporaron para dar 3,13 g (98,3%) del producto diana **5**: $m/z = 551$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

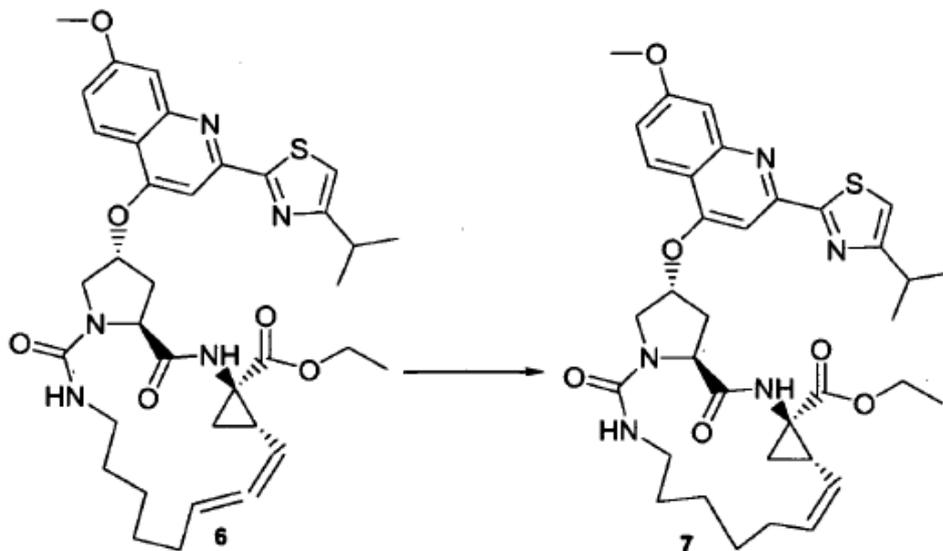
Paso E



10 Se añadió NaHCO_3 (1,0 g) a una solución de **5** (1,4 g, 2,5 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml). A continuación, se añadió fosgeno (5 ml, 1,9 M en tolueno) a 0°C bajo argón. La suspensión resultante se agitó durante 40 min a la temperatura ambiente (monitorización con LC-MS). A continuación, se filtró la mezcla de reacción y se lavó con THF (2×30 ml). El filtrado se concentró por evaporación rotativa y se redisolvió en CH_2Cl_2 (50 ml). Se añadieron NaHCO_3 (1,0 g) y *N*-metilhept-6-enilamina (1,5 g, 13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche, y se filtró luego. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (éter) proporcionó 1,42 g (84%) del producto diana **6**: $m/z = 690$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

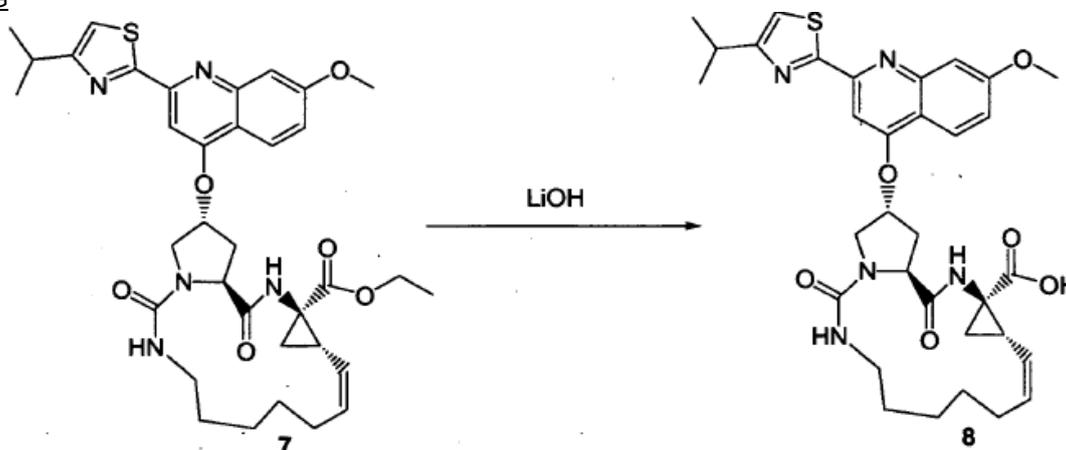
15

Paso F



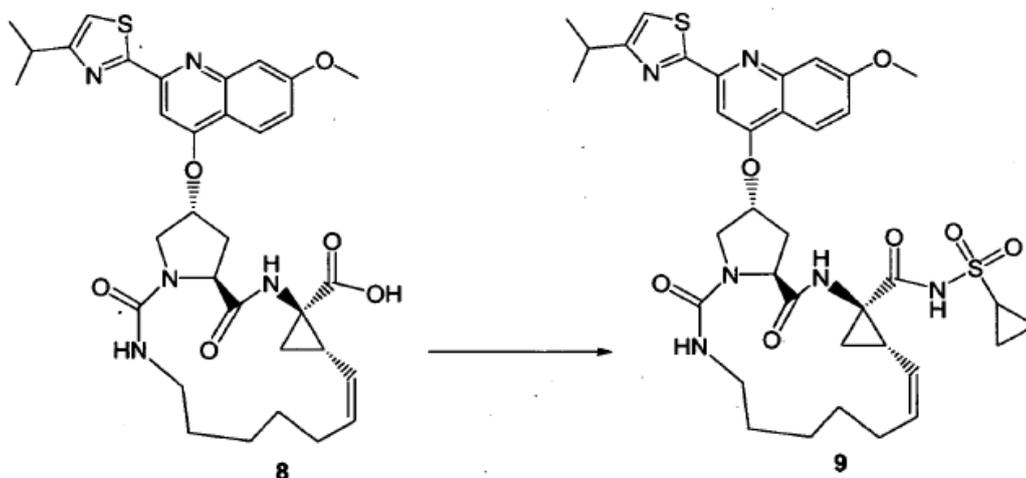
Una solución de **6** (1,42 g, 2 mmol) en dicloroetano seco (900 ml, solución 0,0023M) se borboteó con argón durante aproximadamente 15 min. Se añadió a continuación catalizador Hoveyda-Grubbs de primera generación (120 mg, 12% mol) y la mixtura de reacción se calentó a reflujo bajo agitación con un flujo lento de argón durante 16 h. La mixtura de reacción se enfrió luego a la temperatura ambiente y se añadió a la mixtura agente de barrido de paladio MP-TMT (aproximadamente 200 mg). Después de 2,5 horas, el agente de barrido se eliminó por filtración y se lavó con 50 ml de CH₂Cl₂. La solución obtenida se concentró por evaporación rotativa. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílice YMC (100 g, EtOAc/hexano 1:1) para dar 806 mg (570%) del producto diana **7**: *m/z* 662 (M+H)⁺.

Paso G



Se añadió hidróxido de litio (300 mg) en agua (6 ml) a una solución del éster macrocíclico **7** (806 mg, 2,1 mmol) en tetrahidrofurano (12 ml) y metanol (6 ml). Después de 1 hora a 50°C, se redujo el volumen a la mitad por evaporación y se añadió agua (30 ml). La acidificación (pH = 2) seguida por extracción con cloroformo dio 760 mg del producto diana **8** como un polvo blanco: *m/z* = 662 (M+H)⁺.

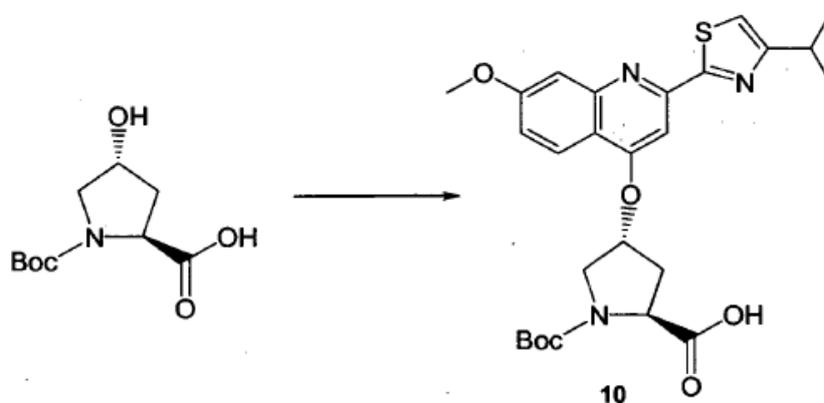
Paso H



Una solución del ácido **8** (760 mg, 1,2 mmol) y CDI (389 mg, 2,4 mmol, 2 eq) en THF seco (10 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas bajo N₂. Opcionalmente, puede aislarse el derivado de azalactona, en caso deseado. La mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente y se añadió una mezcla de sulfonamida, preparada como se describe en WO03/053349 (436 mg, 3,6 mmol, 3 eq) y DBU (0,5 ml, 3 mmol) en THF seco (10 ml). La solución resultante se calentó a 55°C durante 18 horas (monitorizado por LC-MS). A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente, se evaporó el disolvente y el residuo se repartió entre EtOAc y agua (pH ajustado a 3,0 con HCl). El material bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/éter de petróleo 1:1) para dar 380 mg del producto diana contaminado con hasta 20% de la sulfonamida de partida (determinación por NMR). Este material se purificó por cromatografía en columna en una columna previamente rellena (gradiente de éter a éter/THF, 3:1). Una tercera purificación por cromatografía en columna (sílice YMC 50 g, éter, seguido por éter-metanol 9:1) proporcionó 176 mg del compuesto del título como un polvo ligeramente amarillo, que se purificó ulteriormente por HPLC preparativa para dar 55 mg del compuesto del título como un polvo amarillento, $m/z = 737$, $(M+H)^+$, datos NMR (125 MHz, CDCl₃): ¹³C, δ 6,3, 6,5, 6,9, 22,0, 22,7, 22,8, 25,4, 26,7, 28,6, 29,1, 29,7, 31,3, 32,7, 34,7, 38,4, 45,3, 51,8, 55,8, 60,1, 77,0, 96,7, 107,5, 114,7, 116,5, 119,4, 123,2, 125,8, 136,4, 151,4, 153,1, 157,7, 160,2, 161,8, 165,5, 168,2, 168,7, 178,2.

Ejemplo 2: Síntesis de *N*-[17-(2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-il-oxi)-13-metil-2,14-dioxo-3,13,15-triazatriciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil](ciclopropil)sulfonamida, con la estereoquímica específica representada en el compuesto (**16**) a continuación.

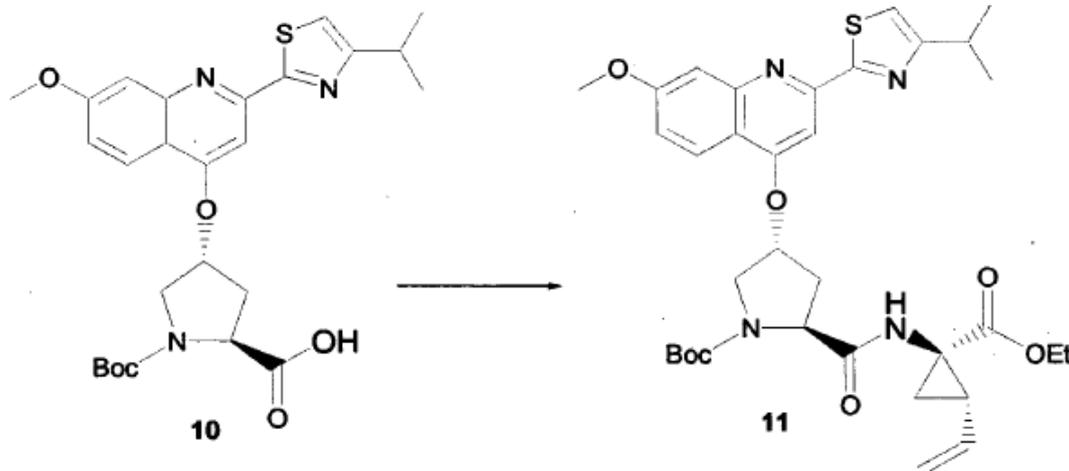
PROCEDIMIENTO A:



Paso A

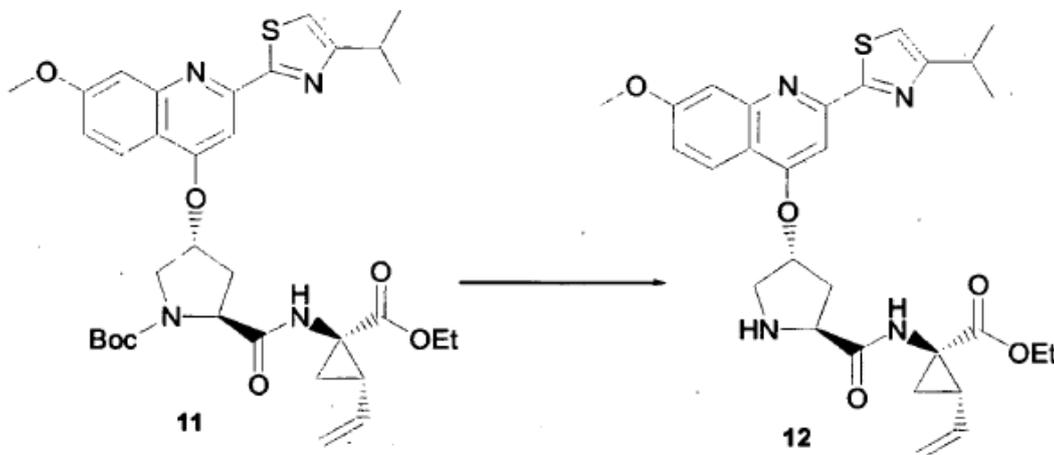
A una solución agitada de BOC-4-hidroxiprolina, con la estereoquímica específica que se ilustra en la fórmula anterior (2,59 g, 11,2 mmol) en DMSO (80 ml) se añadió *tert*-butóxido de potasio (3,77 g, 33,6 mmol). Después de 1 hora de agitación a la temperatura ambiente, se añadió el cloruro de quinoleína **2** (3,57 g, 11,2 mmol) y la solución se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluyó con agua (350 ml), se lavó con EtOAc (100 ml), y se acidificó a aprox. pH 3 con HCl 1 M. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc (3 × 100 ml), se lavó con salmuera, y se secó sobre MgSO₄. Después de evaporación, se obtuvo el compuesto **10** (3,60 g, 62%).

Paso B



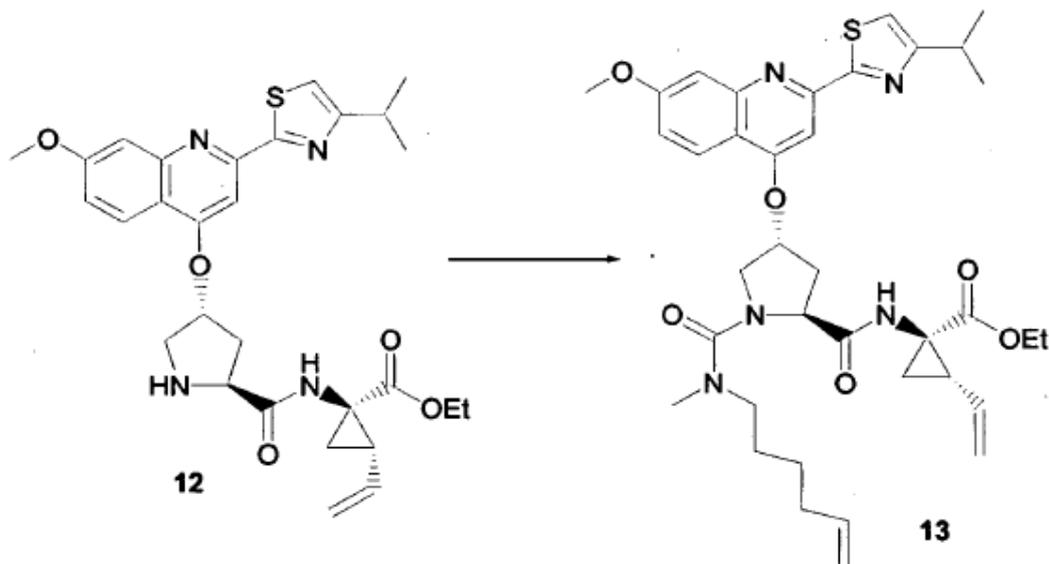
- 5 El compuesto **10** (3,60 g, 7,02 mmol) se disolvió en DMF (20 ml). Se añadió a continuación hidrocloreto del éster
 10 etílico del ácido 1-amino-2-vinil-ciclopropanocarboxílico (1,47 g, 7,68 mmol), y la mixtura de reacción se lavó con-
 cienzudamente con argón y se enfrió a 0°C. Se añadieron DIPEA (3,00 ml, 17,2 mmol) y HATU (2,93 g, 7,66 mmol) y
 la mixtura de reacción se agitó durante 40 minutos a 0°C. La solución se evaporó, se mezcló con NaHCO₃ saturado,
 y se extrajo con EtOAc (3 × 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre
 MgSO₄, y se evaporaron. La cromatografía en columna flash (hexanos/EtOAc 3:2 → hexanos/EtOAc 2:3) propor-
 cionó el compuesto **11** (3,81 g, 84%) como un polvo blanco.

Paso C



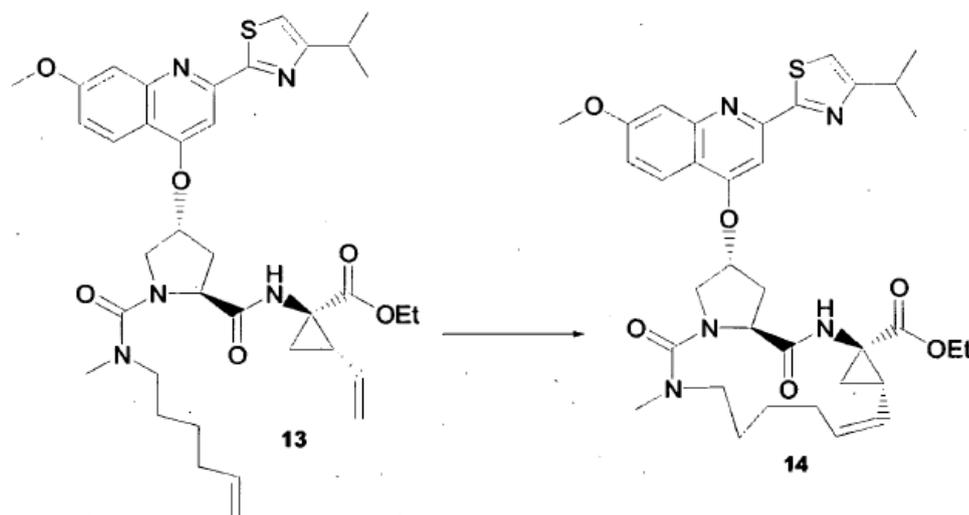
- 15 Una solución de **11** (3,81 g, 5,86 mmol) en CH₂Cl₂ (30 ml) y TFA (30 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante
 1,5 horas. Se evaporaron luego las materias volátiles. Se añadió NaHCO₃ saturado (100 ml) al aceite obtenido y la
 suspensión acuosa espesa se extrajo con dietiléter (3 × 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con
 salmuera, se secaron sobre MgSO₄, y se evaporaron para dar el compuesto **12** (3,13 g, 28%).

Paso D

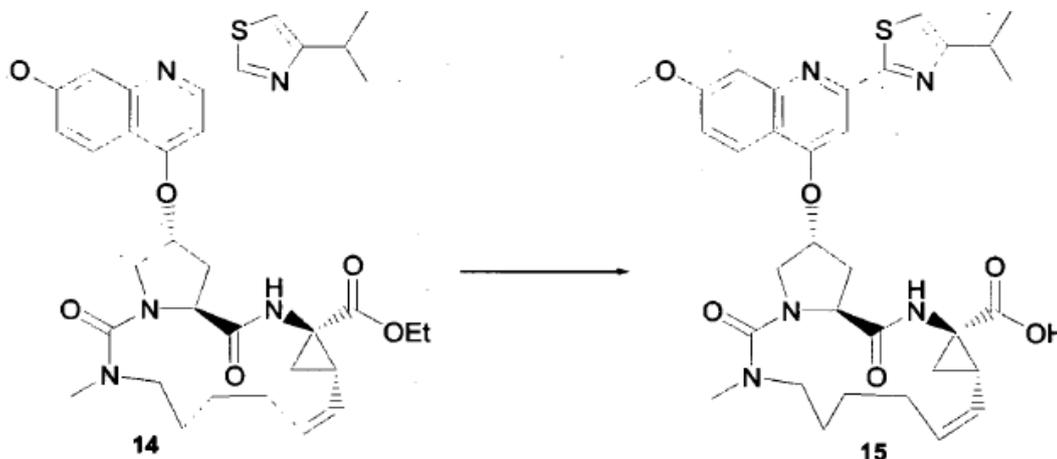


- 5 A una solución de compuesto **12** (1,41 g, 2,56 mmol) en THF (40 ml) se añadieron NaHCO_3 (4 cucharadas) y fosgeno en tolueno (1,93 M, 4,0 ml, 7,7 mmol). La mezcla se agitó enérgicamente durante 1 hora a la temperatura ambiente, después de lo cual se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (40 ml), y se añadieron NaHCO_3 (3 cucharadas) e hidrocloreto de hex-5-enil-metilamina (770 mg, 5,15 mmol). Después de agitar durante una noche a la temperatura ambiente, se filtró la mezcla de reacción, se añadieron aprox. 3 g de sílice, y se evaporó la suspensión acuosa espesa a sequedad. La cromatografía en columna flash (dietiléter \rightarrow 3% metanol en dietiléter) proporcionó el compuesto **13** (1,57 g, 89%) como un polvo ligeramente amarillo.

Paso E

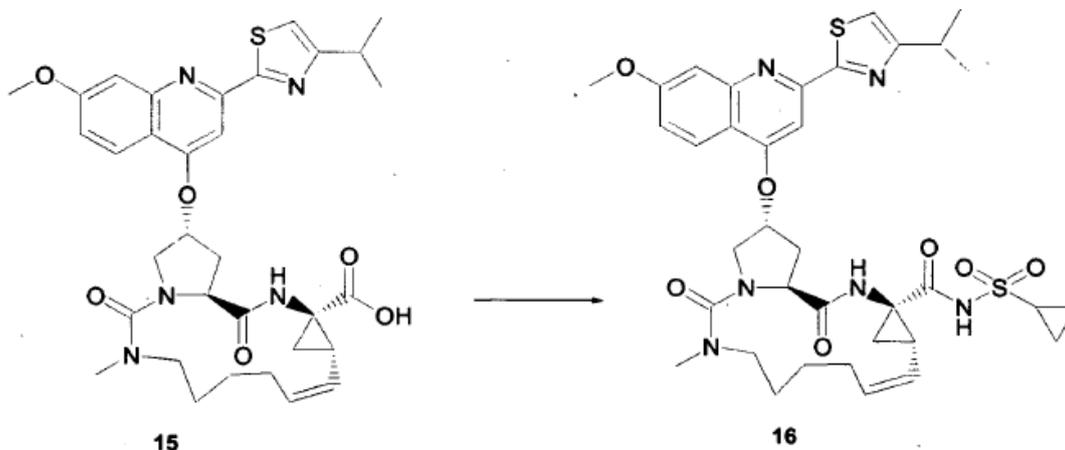


- 15 El compuesto **13** (1,53 g, 2,18 mmol) se disolvió en 1,2-dicloroetano (1,50 l) y la solución se desgasificó con N_2 . Se añadió catalizador Hoveyda-Grubbs de 1ª generación (95 mg, 0,16 mmol) y la mezcla se mantuvo a reflujo durante una noche bajo N_2 . La solución se dejó enfriar a 60°C , después de lo cual se añadió una cucharada del agente de barrido MP-TMT. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas (mientras se enfriaba a la temperatura ambiente), se filtró, y se evaporó. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 , se añadieron aprox. 3 g de sílice, y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. Después de cromatografía en columna flash (dietiléter \rightarrow 3% metanol en dietiléter) se obtuvo el compuesto **14** (1,09 g, 74%) como prismas blancos.

Paso F

5 Se disolvió el compuesto **14** (1,00 g, 1,51 mmol) en THF/metanol/H₂O 2:1:1 (200 ml). Se añadió gota a gota una solución acuosa de LiOH (1 M, 15,1 ml, 15,1 mmol) a la temperatura ambiente durante 10 minutos, y la mezcla de reacción resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 20 horas. La solución se acidificó a aprox. pH 1 con HCl 1 M, y se concentró hasta que se había eliminado prácticamente la totalidad del THF y el metanol. La suspensión acuosa espesa resultante se extrajo con CH₂Cl₂ 4 veces, y las fases orgánicas se agruparon, se secaron (MgSO₄), y se evaporaron para dar el compuesto **15** (960 mg, 100%) como un polvo ligeramente amarillo.

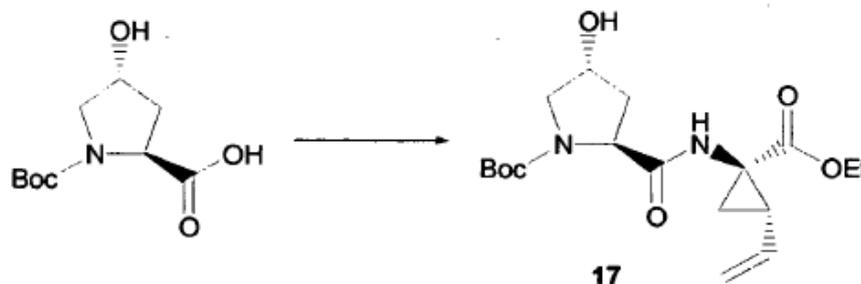
10

Paso G

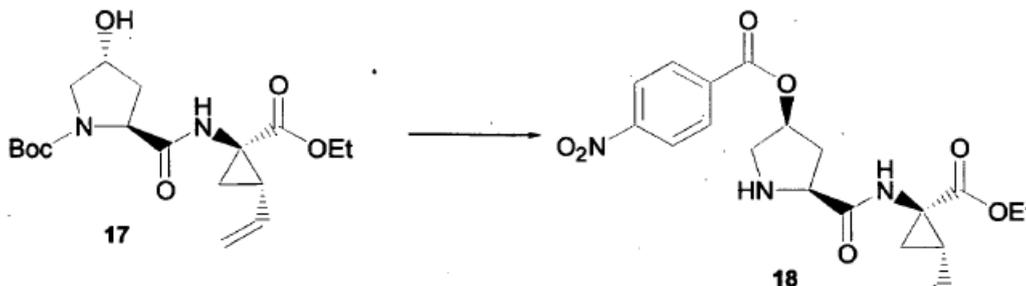
15 Una solución de compuesto **15** (960 mg, 1,51 mmol) en THF (75 ml) se puso en atmósfera de nitrógeno, después de lo cual se añadió carbonildiimidazol (CDI) (510 mg, 3,14 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo bajo N₂ durante 1 hora, y se dejó luego que alcanza la temperatura ambiente. Opcionalmente, puede aislarse el derivado de azalactona en caso deseado. Se añadieron ciclopropilsulfonamina (550 mg, 4,54 mmol) y DBU (530 µl, 540 mg, 3,54 mmol), y la solución se agitó bajo N₂ a 55°C durante una noche. Se evaporó el disolvente y el residuo bruto se disolvió en CH₂Cl₂. Se añadieron aprox. 3 gramos de sílice, y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. La cromatografía en columna flash (dietiléter → 5% metanol en dietiléter) proporcionó el compuesto **16** (960 mg, 86%) como un polvo blanco.

20

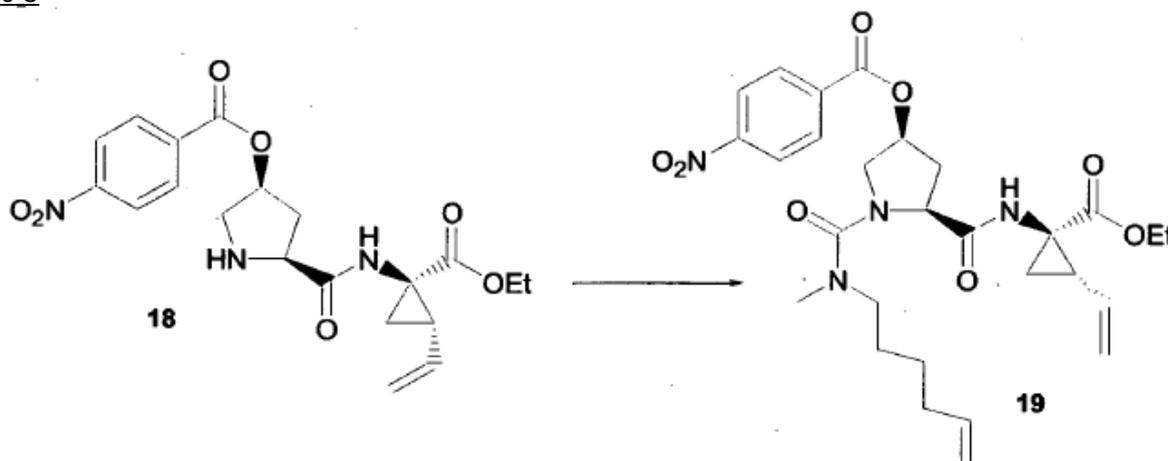
PROCEDIMIENTO B: Síntesis alternativa del ácido **15**.

Paso A

5 4-Hidroxiprolina protegida con Boc (10,2 g, 44,1 mmol), HATU (18,7 g, 49,2 mmol) y el ciclopropiléster (9,31 g, 48,6 mmol), ambos con la estereoquímica específica que se ilustra en las fórmulas anteriores, se disolvieron en DMF (120 ml) y se enfriaron a 0°C. Se añadió diisopropiletilamina (DIPEA) (30,0 ml, 172 mmoles). La solución se dejó calentar a la temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Se añadió CH₂Cl₂ (~80 ml) y la mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, ácido cítrico, H₂O, y salmuera, y se secó después (MgSO₄). Se añadieron aprox. 30 g de sílice y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. La purificación por cromatografía en columna flash (dietiléter → 7% metanol en dietiléter) dio el compuesto **17** (13,0 g, 80%) como un polvo blanco.

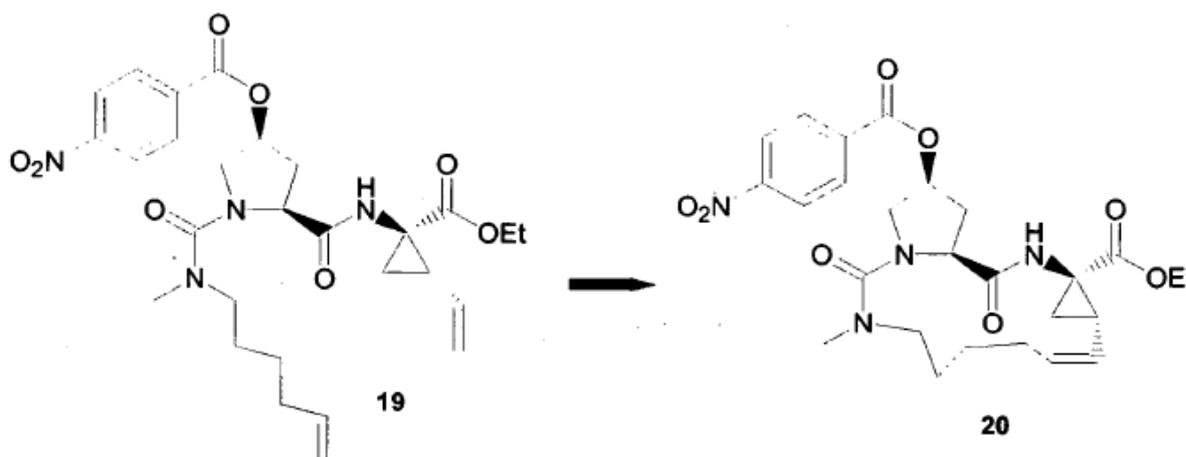
Paso B

15 El compuesto **17** (8,11 g, 22,0 mmol), ácido p-nitrobenzoico (5,51 g, 33,0 mmol) y Ph₃P (8,66 g, 33,0 mmol) se disolvieron en THF (100 ml). La solución se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota DIAD (6,50 ml, 33,0 mmoles). La mezcla de reacción se dejó calentar a la temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Se añadió NaHCO₃ acuoso saturado (60 ml) y la mezcla se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. Se agruparon las fases orgánicas y se secaron (MgSO₄), después de lo cual se añadieron aprox. 40 g de sílice y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. La purificación por cromatografía en columna flash (pentano/dietiléter 2:1 → pentano/dietiléter 1:2 → 2% metanol en dietiléter) dio el compuesto intermedio protegido con Boc (9,50 g, 83 %) como un polvo blanco. Este compuesto intermedio (9,50 g, 18,4 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (66 ml) y la solución se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota TFA (33 ml), y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporaron las materias volátiles, se añadió CH₂Cl₂ (100 ml) y se añadió Na₂CO₃ acuoso (0,50 M) hasta que se alcanzó pH aprox. 8. Después de la separación, la fase orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar el compuesto **18** (7,68 g, 83%) como un polvo ligeramente amarillo.

Paso C

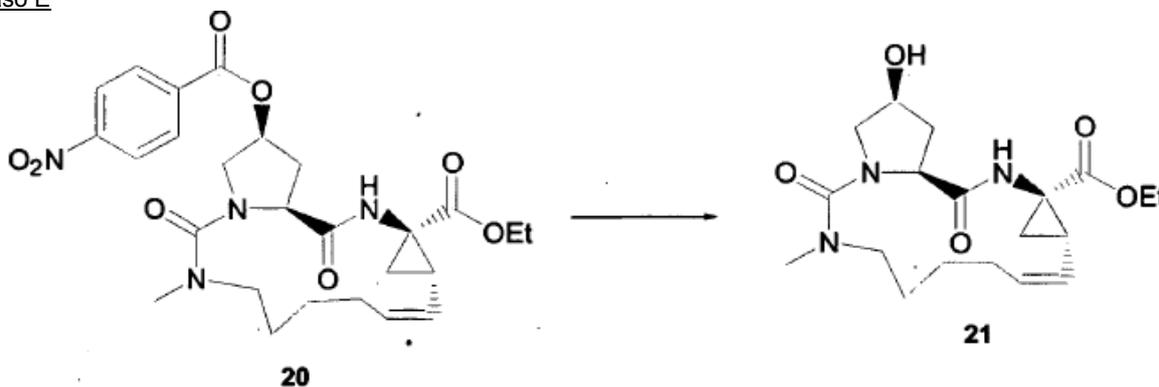
A una solución del compuesto **18** (6,90 g, 16,5 mmol) en THF (240 ml) se añadieron NaHCO₃ (15 cucharadas) y fosgeno en tolueno (1,93 M, 18,0 ml, 34,7 mmol). La mezcla se agitó enérgicamente durante 1 hora a la temperatura ambiente, después de lo cual se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (250 ml), y se añadieron NaHCO₃ (15 cucharadas) e hidrocloreuro de hex-5-enil-metilamina (5,00 g, 33,4 mmoles). Después de agitar durante una noche a la temperatura ambiente, se filtró la mezcla de reacción, se añadieron aprox. 17 g de sílice, y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. La cromatografía en columna flash (dietiléter → 3% metanol en dietiléter) proporcionó el compuesto **19** (8,00 g, 87%) como un polvo blanco.

Paso D



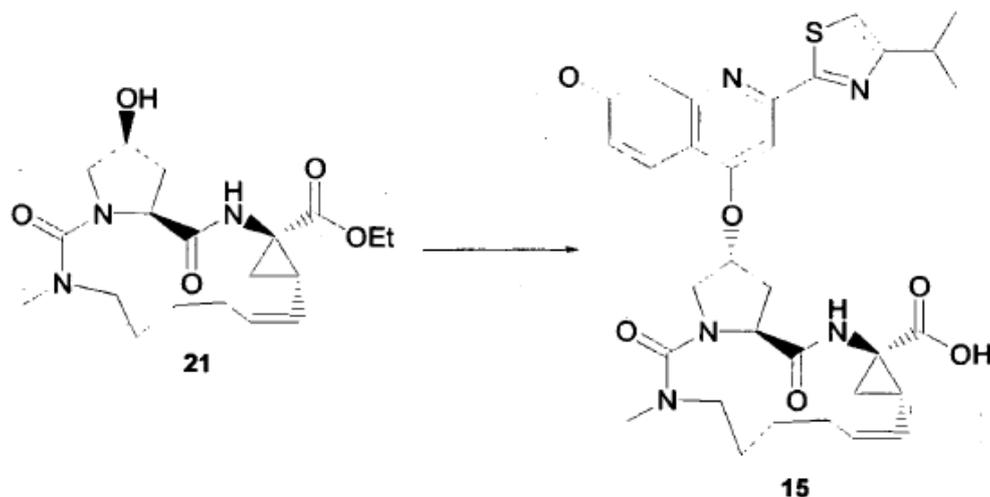
El compuesto **19** (1,61 g, 2,90 mmol) se disolvió en 1,2-dicloroetano (1,50 l) y la solución se desgasificó con N₂. Se añadió catalizador Hoveyda-Grubbs de 1^a generación (125 mg, 0,21 mmol) y la mezcla se mantuvo a reflujo durante noche bajo N₂. La solución se dejó enfriar a 60°C, después de lo cual se añadió una cucharada del agente de barrido MP-TMT. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas (mientras se enfriaba a la temperatura ambiente), se filtró, y se evaporó. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂, se añadió aprox. 3 g de sílice, y la suspensión acuosa espesa se evaporó a sequedad. Después de cromatografía en columna flash (dietiléter → 3% metanol en dietiléter) se obtuvo el compuesto **20** (1,13 g, 74%) como un polvo grisáceo.

Paso E



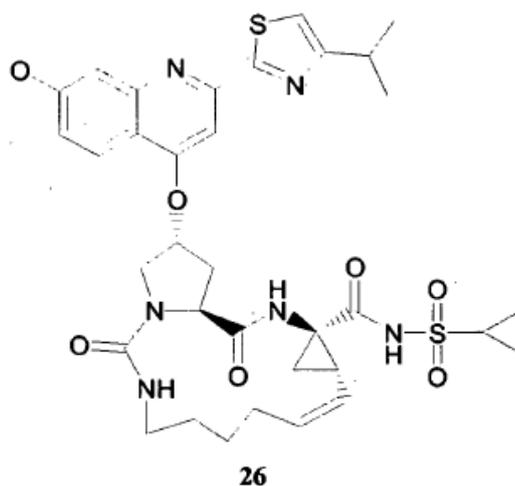
El compuesto **20** (200 mg, 0,38 mmol) se disolvió en una mezcla de THF/metanol/agua (2:1:1, 20 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió lentamente LiOH acuoso (1 M, 1,9 ml, 1,9 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 4 horas, se neutralizó luego con HCl 1 M y se extrajo con CH₂Cl₂. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, agua, y salmuera. Después de secado (MgSO₄) y evaporación, el residuo bruto se purificó por cromatografía en columna flash (2% metanol en CH₂Cl₂ → 4% metanol en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **21** (115 mg, 80%) como un polvo grisáceo.

Paso F

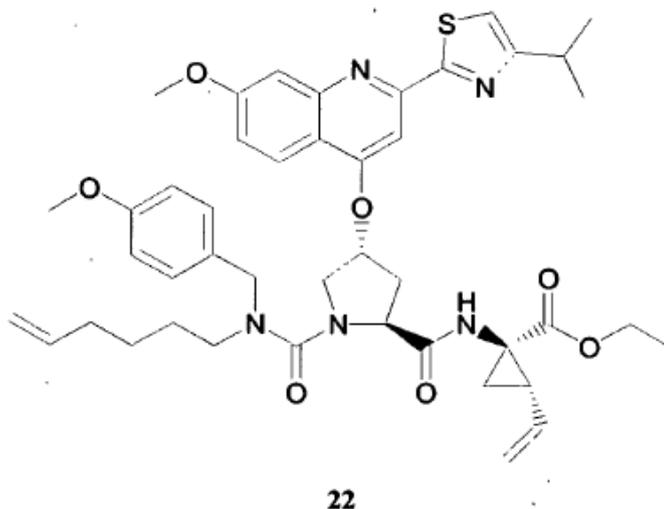


5 El compuesto **21** (100 mg, 0,26 mmol), Ph_3P (100 mg, 0,38 mmol) y 2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-ol (**1**) (117 mg, 0,39 mmol) se mezclaron en THF (10-15 ml), y la suspensión acuosa espesa se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota DIAD (77 μl , 0,39 mmol). Se retiró luego el baño de hielo y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 12 horas. Se evaporó el disolvente y el producto bruto se disolvió en THF/metanol/agua 2:1:1 (12 ml). Se añadió LiOH acuoso (1 M, 3,80 ml, 3,80 mmol) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. Se duplicó el volumen por adición de agua y la suspensión acuosa espesa se extrajo con dietiléter. La fase acuosa se acidificó a pH aprox. 1 con HCl 1 M y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase de CH_2Cl_2 se secó (MgSO_4) y se evaporó. Se obtuvo el producto deseado por cromatografía en columna flash (2% metanol en dietiléter hasta que se eluyó el exceso de quinoleína **1**, y a continuación 10% metanol en CH_2Cl_2) para dar el compuesto **15** (71 mg, 42%).

15 Ejemplo 3: Preparación de ácido ciclopropanosulfónico {17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]-octadec-7-eno-4-carbonil}-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**26**) a continuación:

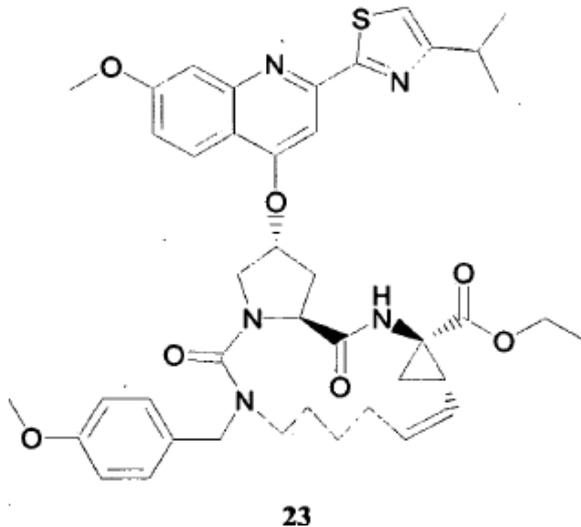


20 Paso A: Preparación del éster etílico del ácido 1-({1-[hex-5-enil-(4-metoxibencil)-carbamoil]-4-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-pirrolidina-2-carbonil}-amino)-2-vinil-ciclopropanocarboxílico, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**22**) a continuación:



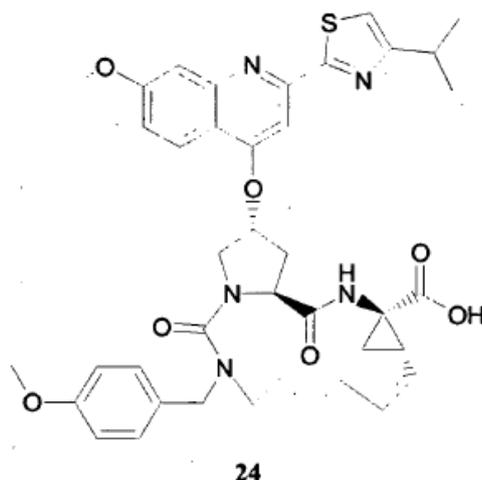
El compuesto **5**, preparado en el Ejemplo 1, Paso D (1,97 g, 3,58 mmol) se mezcló con aprox. 200 mg de NaHCO₃ (2 cucharaditas) y THF (20 ml). Se añadieron a la mezcla de reacción 3 ml de fosgeno 1,9 M en tolueno y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 1,5 horas a la temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por LC-MS. El material de partida desapareció y se formó el pico del compuesto intermedio clorocarbonilo (> 90% de acuerdo con los datos LC-MS). La mezcla de reacción se filtró y se concentró por evaporación rotativa. Se disolvió luego la misma en CH₂Cl₂ y se añadió hex-5-enil-(p-metoxi-bencil)-amina (0,9 gramos) junto con 100-150 mg (1 cucharada) de NaHCO₃. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche y se filtró luego y purificó por cromatografía en columna sobre sílice (EtOAc/éter de petróleo) para dar el compuesto puro del título **22** (1,42 g, 84%). MS (M⁺) 797.

Paso B: Preparación del éster etílico del ácido 17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-13-(4-metoxibencil)-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carboxílico, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**23**) a continuación:



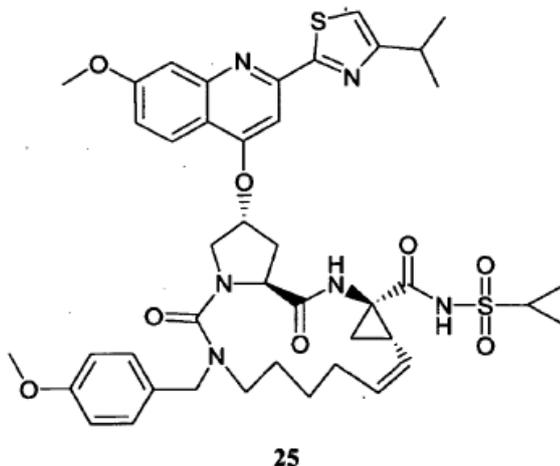
El compuesto **22** (1,68 g, 2,1 mmol) tal como se preparó en el Paso A, se disolvió en dicloroetano seco (destilado sobre CaH, aproximadamente 800 ml) y se borboteó con argón durante aprox. 10 minutos. Se añadió luego el catalizador Hoveyda de 1^a generación (88 mg, 7% mol) a la solución y se calentó la mezcla de reacción a 100°C mientras se agitaba con una corriente lenta de argón durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego a la temperatura ambiente, se añadió el agente de barrido de paladio MP-TMT (aprox. 100 mg) y la mezcla se agitó durante 2,5 horas. Se retiró el agente de barrido por filtración y se lavó con 100 ml de CH₂Cl₂. La solución obtenida se concentró por evaporación rotativa y se secó a alto vacío, lo cual dio el compuesto del título (*m/z* = 599, (M+H)⁺), pureza por HPLC 79% (red de diodos), 95% (ELSD). Rendimiento 63 %.

Paso C: Preparación de ácido 17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-13-(4-metoxibencil)-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carboxílico, con la estereoquímica específica que se representa a continuación en el compuesto (**24**):



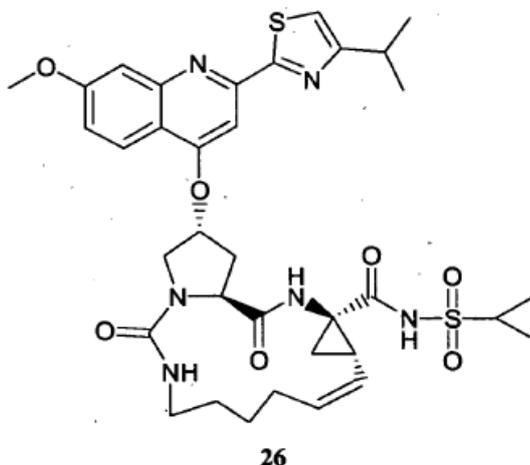
El compuesto **23** (910 mg, 1,2 mmol) tal como se preparó en el Paso B, se disolvió en 30 ml de THF, 15 ml de metanol y 15 ml de agua. Se añadió LiOH acuoso 1 M (10 ml) a la solución. La reacción se agitó durante 2 horas a 50°C, para permitir que reaccionara todo el material de partida (lo que se comprobó por LC-MS). La mezcla de reacción se acidificó con ácido cítrico, se extrajo con cloroformo (3 × 75 ml) y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄. El producto bruto se purificó por cromatografía flash (en gradiente, comenzando con un gradiente acetato de etilo/hexano 2:1) para proporcionar el compuesto del título (**24**) como un sólido ligeramente amarillo (864 mg). Pureza por HPLC 96%.

Paso D: Preparación de ácido ciclopropanosulfónico [17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-13-(4-metoxibencil)-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**25**) a continuación:



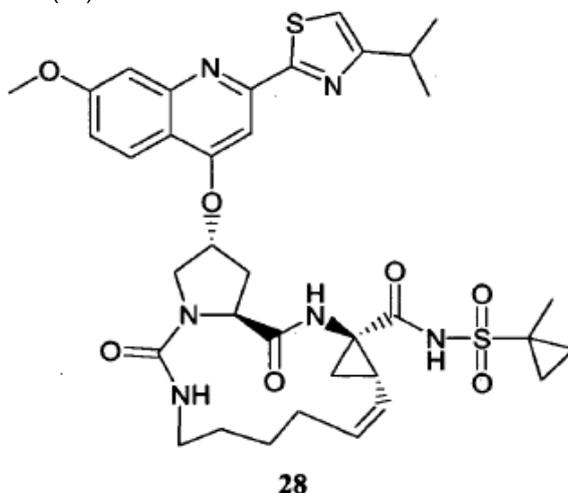
El compuesto **24** (50 mg, 0,068 mmol, 1 eq) se mezcló con CDI (44 mg, 3 eq) y se disolvió en THF (1,0 ml) en un vial microondas de 2 ml. Se fijó la tapa y el vial se lavó concienzudamente con argón. La activación se realizó en un microondas durante 12 minutos a 100°C (normal; sin agitación previa). La reacción se comprobó por LC-MS (100% conversión en el compuesto intermedio activado - masa menos luego el sustrato: M⁺-16). Opcionalmente, puede aislarse el derivado de azalactona, si se desea. Se mezcló ciclopropil-sulfonamida (49 mg, 4 eq) con THF y se añadió DBU (60 µl, 4 eq) en un vial separado. Después de activación completa, se añadió la mezcla mediante una jeringuilla al vial de reacción. La mezcla de reacción se calentó en un microondas a 100°C durante 1 hora. Se concentró la mezcla de reacción por evaporación rotativa, se mezcló con EtOAc y agua, y se añadió 1 gota de HCl 3 M. La fase acuosa se lavó con EtOAc (3 × 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. Después de filtración del agente de secado y concentración por evaporación rotativa, el producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice YMC (~70 mg, acetato de etilo, R_f = 0,7, sulfonamida de partida 0,6). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron por evaporación rotativa para dar el compuesto **25** (83 mg, rendimiento 98%) con 86% de pureza. El compuesto se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente.

Paso E: Preparación de ácido ciclopropanosulfónico {17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil}-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**26**) a continuación:

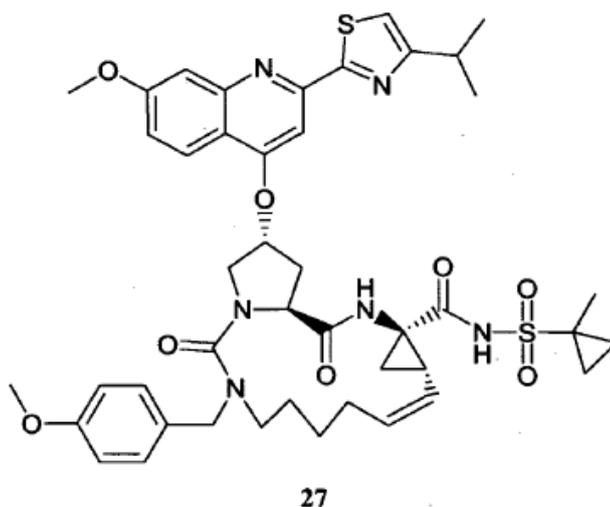


5 El compuesto **25** (65 mg, 0,077 mmol) se disolvió en 4 ml de DCM. Se añadieron 2 ml de TFA y la solución se agitó durante 20 minutos. La mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación con NaHCO₃ y CHCl₃. Se realizaron extracciones con CHCl₃ (3 × 50 ml) y lavado con NaHCO₃ (2 × 50 ml) y salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró por evaporación rotativa. El producto bruto se purificó por cromatografía flash sobre sílice YMC (20 g, dietiléter) lo cual dio el producto **26** como un sólido blanco (25 mg, rendimiento 45 %).

10 Ejemplo 4: Preparación de ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**28**) a continuación:

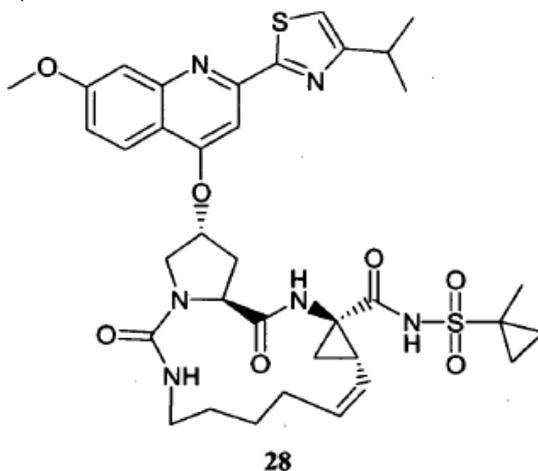


15 Paso A: Preparación de ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-13-(4-metoxibencil)-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**27**) a continuación:



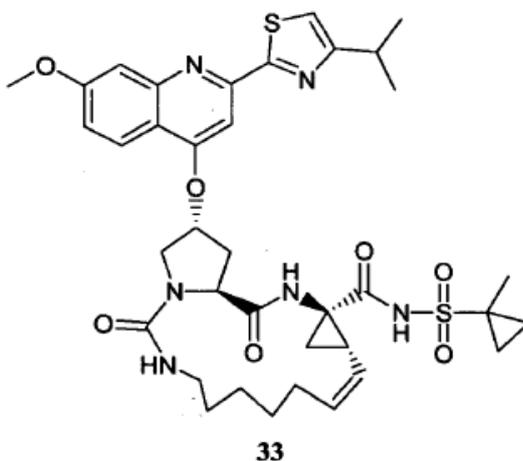
Se siguió el procedimiento descrito en el Paso D del Ejemplo 3, pero utilizando 1-metil-ciclopropil-sulfonamida en lugar de ciclopropil-sulfonamida (preparada como se describe en WO2004/043339), lo cual dio el compuesto del título (**27**) (24,5 mg, 43%) como un sólido blanco después de purificación por cromatografía en columna sobre sílice (eluyente, dietiléter).

Paso B: Preparación de ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [17-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxi-quinolein-4-iloxi]-2,14-dioxo-3,13,15-triaza-triciclo[13.3.0.0^{4,6}]octadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**28**) a continuación:

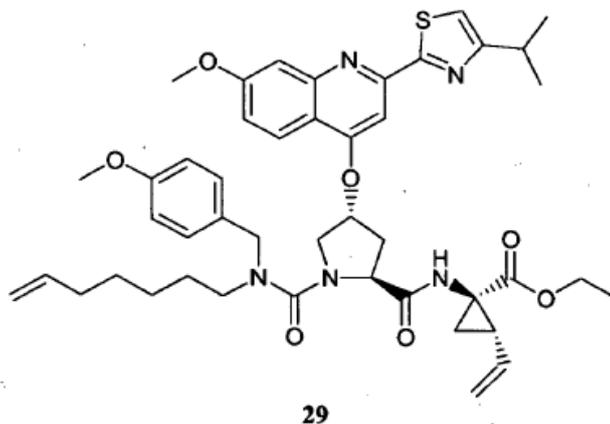


El compuesto **27** (20 mg, 0,023 mmol) se disolvió en 3 ml de cloruro de metileno, se añadió 1 ml de TFA y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 20 minutos. La HPLC demostró la ausencia de material de partida. Se añadió a la mezcla de reacción una solución de NaHCO₃ saturado (5 ml) y la mezcla resultante se extrajo en CH₂Cl₂. El extracto orgánico se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró por evaporación rotativa. El aceite resultante se purificó por cromatografía en columna sobre sílice YMC (20 g, dietiléter) lo cual dio el compuesto del título (**28**) (14,7 mg, 85%) como polvo blanco. Pureza por HPLC >95 %.

Ejemplo 5: Preparación de ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxi-quinolein-4-iloxi]-2,15-dioxo-3,14,16-triaza-triciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa a continuación en el compuesto (**33**):

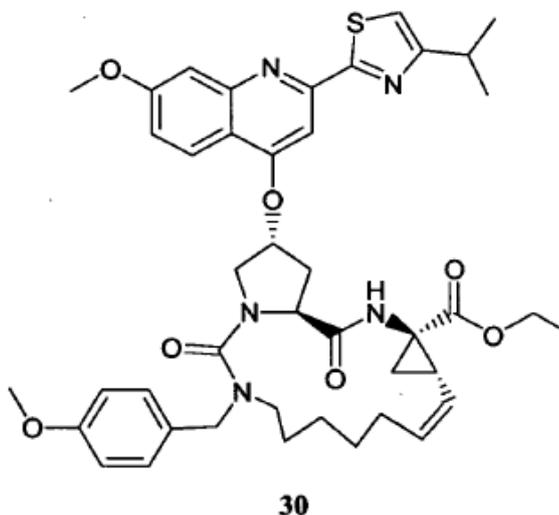


5 Paso A: Preparación del éster etílico del ácido 1-[[1-[hept-6-enil-(4-metoxibencil)-carbamoil]-4-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-pirrolidina-2-carbonil]-amino]-2-vinil-ciclopropanocarboxílico, con la estereoquímica específica que se representa a continuación en el compuesto (29):



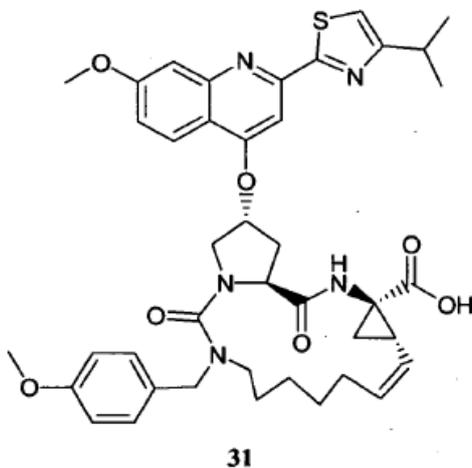
10 El compuesto del título **29** se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Paso A del Ejemplo 3, pero utilizando hept-6-enil-(p-metoxibencil)-amina en lugar de hex-5-enil-(p-metoxibencil)-amina.

Paso B: Preparación del éster etílico del ácido 18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-14-(4-metoxibencil)-2,15-dioxo-3,14,16-triaza-triciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (30) a continuación:



15 El compuesto obtenido en el Paso A (29) se trató de acuerdo con el procedimiento descrito en el Paso B del Ejemplo 3, lo cual dio el compuesto del título (30).

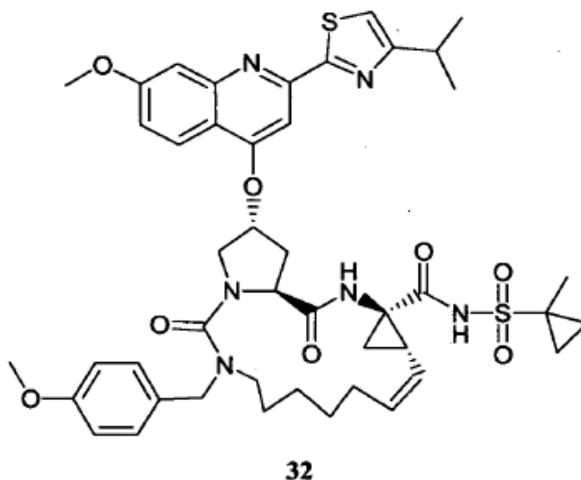
Paso C: Preparación del ácido 18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-14-(4-metoxi-bencil)-2,15-dioxo-3,14,16-triaza-triciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carboxílico, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**31**) a continuación:



5

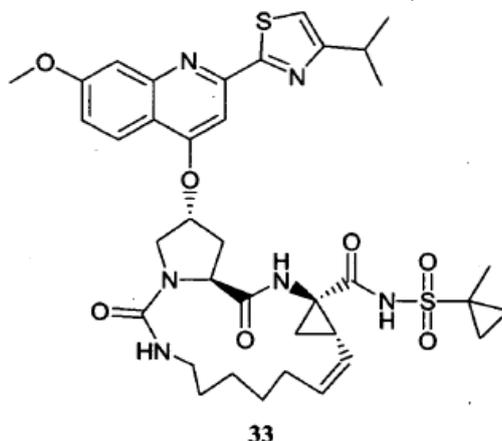
El compuesto obtenido en el Paso B (**30**) se trató de acuerdo con el procedimiento descrito en el Paso C del Ejemplo 3, lo cual dio el compuesto del título (**31**).

10 **Paso D:** Preparación del ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-14-(4-metoxibencil)-2,15-dioxo-3,14,16-triaza-triciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**32**) a continuación:



15 El compuesto obtenido en el Paso C anterior (**31**) se trató de acuerdo con el procedimiento descrito en el Paso D del Ejemplo 3, pero utilizando LiHMDS como base en lugar de DBU (4 eq, solución 1 M en THF). La reacción era completa después de 2 horas a la temperatura ambiente. El compuesto del título (**32**) se obtuvo como un sólido blanco después de purificación por cromatografía en columna sobre sílice, y se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

20 **Paso E:** Preparación de ácido 1-metil-ciclopropanosulfónico [18-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxiquinolein-4-iloxi]-2,15-dioxo-3,14,16-triaza-triciclo[14.3.0.0^{4,6}]nonadec-7-eno-4-carbonil]-amida, con la estereoquímica específica que se representa en el compuesto (**33**) a continuación:



El compuesto obtenido en el Paso D anterior (**32**) (100 mg) se trató de acuerdo con el procedimiento descrito en el Paso E del Ejemplo 3, lo cual dio el compuesto del título (**33**) (55 mg, 73%).

5

Ejemplo 6: Actividad de los compuestos de fórmula (I)

Ensayo de replicones

Los compuestos de fórmula (I) se examinaron en cuanto a actividad en la inhibición de la replicación del RNA de HCV en un ensayo celular. El ensayo demostró que los compuestos de fórmula (I) exhibían actividad contra los replicones de HCV funcionales en un cultivo de células. El ensayo celular estaba basado en un constructo de expresión bicistrónico, como ha sido descrito por Lohmann et al. (1999) Science vol. 285 pp. 110-113 con modificaciones descritas por Krieger et al. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, en una estrategia de apantallado multidiana. En esencia, el método era como sigue:

El ensayo utilizaba la línea de células Huh-7 luc/neo transfectada establemente (a la que se hace referencia en lo sucesivo como Huh-Luc). Esta línea de células alberga un RNA que codifica un constructo de expresión bicistrónico que comprende las regiones de tipo salvaje NS3-NS5B del HCV tipo 1b traducidas desde un Sitio de Entrada de Ribosoma Interno (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), precedidas por una porción informadora (FfL-luciferasa), y una porción marcadora seleccionable (neo[®], neomicina-fosfotransferasa). El constructo está limitado por NTRs (regiones no traducidas) 5' y 3' del HCV tipo 1b. El cultivo continuado de las células replicón en presencia de G418 (neo[®]) depende de la replicación del RNA de HCV. Las células replicón transfectadas establemente que expresan RNA de HCV, que se replica autónomamente y a niveles altos, codificando *inter alia* luciferasa, se utilizan para apantallar los compuestos antivirales.

Las células replicón se extendieron en placas de 384 pocillos en presencia de los compuestos de test y de control que se añadieron en diversas concentraciones. Después de una incubación de 3 días, la replicación del HCV se midió por ensayo de la actividad de luciferasa (utilizando sustratos y reactivos estándar de ensayo de luciferasa, y un lector de imágenes de microplacas Perkin Elmer ViewLux[™] ultraHTS). Las células replicón en los cultivos de control exhiben alta expresión de luciferasa en ausencia de cualquier inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto sobre la actividad de luciferasa se monitorizó en las células Huh-Luc, haciendo posible la construcción de una curva dosis-respuesta para cada compuesto testado. Se calcularon luego los valores CE50, valor que representa la cantidad del compuesto requerida para reducir al 50% el nivel de actividad de luciferasa detectado, o más específicamente, la capacidad del RNA del replicón de HCV enlazado genéticamente para replicarse.

Ensayo de inhibición

La finalidad de este ensayo *in vitro* era medir la inhibición de los complejos de proteasa NS3/4A de HCV por los compuestos de la presente invención. El ensayo proporciona una indicación de la eficacia que podrían tener los compuestos de la presente invención en la inhibición de la actividad proteolítica del HCV de NS3/4a.

La inhibición de la enzima proteasa NS3 de longitud total de la hepatitis C se midió esencialmente como se describe en Poliakov, 2002 Prot. Expression & Purification 25, 363-371. Resumidamente, la hidrólisis de un sustrato de péptido, Ac-DED(Edans)EEAbuψ[COO]ASK(Dabcyl)-NH₂ (AnaSpec, San José, EE.UU.), se midió espectrofluorométricamente en presencia de un cofactor peptídico KKGSVVIVGRIVLSGK (Åke Engström, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Suecia). [Landro, 1997 #Biochem 36 9340-9348]. La enzima (1 nM) se incubó en HEPES 50 mM, pH 7,5, DTT 10 mM, 40% glicerol, 0,1% n-octil-D-glucosido, con cofactor NS4A 25 μM e inhibidor a 30°C durante 10 min, después de lo cual se inició la reacción por adición de sustrato 0,5 μM. Los inhibidores se disolvieron en DMSO, se trataron por ultrasonidos durante 30 s y se agitaron enérgicamente. Las soluciones se guardaron a -20°C entre las mediciones.

La concentración final de DMSO en la muestra de ensayo se ajustó a 3,3%. La tasa de hidrólisis se corrigió por los efectos internos de los filtros de acuerdo con procedimientos publicados. [Liu, 1999 Analytical Biochemistry 267,

50

331-335]. Se estimaron los valores K_i por análisis de regresión no lineal (GraFit, Erithacus Software, Staines, MX, Reino Unido), utilizando un modelo para inhibición competitiva y un valor fijo para K_m ($0,15 \mu\text{M}$). Se realizó un mínimo de dos réplicas para todas las mediciones.

- 5 La Tabla 1 siguiente enumera los compuestos que se prepararon de acuerdo con uno cualquiera de los ejemplos anteriores. Las actividades de los compuestos testados se representan también.

Tabla 1

Ejemplo n°.	Compuesto n°.	CE_{50} Ensayo de replicones (μM)	K_i Ensayo enzimático (nM)
Ejemplo 1	9	$7,0 \times 10^{-3}$	0,12
Ejemplo 2	16	$5,5 \times 10^{-2}$	0,45
Ejemplo 3	26	$6,4 \times 10^{-3}$	0,4
Ejemplo 4	28	$2,3 \times 10^{-3}$	0,3
Ejemplo 5	33	$3,6 \times 10^{-3}$	0,3

10 Ejemplo 7: Permeabilidad de los compuestos de fórmula (I)
Este ejemplo mide el transporte de los compuestos de fórmula (I) a través de las células del canal gastroentérico humano. El ensayo utiliza las células bien conocidas Caco-2 con un número de pasadas entre 40 y 60.

15 Transporte apical (A) a basolateral (B)

Se testó cada compuesto en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y los apicales contenían 1,5 ml y 0,4 ml de tampón de transporte (TB), respectivamente, y la concentración estándar de las sustancias testadas era $10 \mu\text{M}$. Adicionalmente todas las soluciones de test y los tampones contenían 1% de DMSO. Antes del experimento, las placas de transporte se recubrieron previamente con medio de cultivo que contenía 10% de suero durante 30 minutos a fin de evitar la fijación inespecífica al material plástico. Después de 21 a 28 días en cultivo sobre soportes de filtro, las células estaban listas para los experimentos de permeabilidad.

La placa de transporte número 1 comprendía 3 filas de 4 pocillos cada una. La fila 1 se designó "lavado", la fila 2 "30 minutos" y la fila 3 "60 minutos". La placa de transporte número 2 comprendía 3 filas de 4 pocillos, una fila 4 designada "90 minutos", una fila 5 "120 minutos" y la fila restante sin asignar.

Se retiró el medio de cultivo de los pocillos apicales y las inserciones se transfirieron a una fila de lavado (número 1) en una placa de transporte (placa número 1) de 2 placas sin inserciones, que se habían preparado ya con 1,5 ml de tampón de transporte (HBSS, HEPES 25 mM, pH 7,4) en las filas 1 a 5. En el cribado A \rightarrow B, el TB en el pocillo basolateral contenía también 1% de Seroalbúmina Bovina.

Se añadieron 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a las inserciones y las monocapas de células se equilibraron en el sistema tampón de transporte durante 30 minutos a 37°C en un agitador de sacudidas Polymix. Después de equilibrarse al sistema tampón, se midió el valor de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en cada pocillo mediante un instrumento de palillo EVOM. Los valores TEER estaban comprendidos usualmente entre 400 y 1000 Ω por pocillo (dependiendo del número de pasadas utilizado).

El tampón de transporte (TB, pH 6,5) se retiró del lado apical y la inserción se transfirió a la fila de 30 minutos (número 2) y se añadieron 425 μl nuevos de TB (pH 6,5), con inclusión de la sustancia de test al pocillo apical (donante). Las placas se incubaron en un agitador de sacudidas Polymix a 37°C con una velocidad de agitación baja de aproximadamente 150 a 300 rpm. Después de 30 minutos de incubación en la fila 2, se desplazaron las inserciones a pocillos nuevos basolaterales (receptores) precalentados cada 30 minutos; fila 3 (60 minutos), 4 (90 minutos) y 5 (120 minutos).

Se tomaron muestras de 25 μl de la solución apical después de ~ 2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representaban muestras donantes del principio y el final del experimento. Se tomaron 300 μl de los pocillos basolaterales (receptores) en cada momento programado y se midió el post-valor de TEER al final del experimento. A todas las muestras recogidas se añadió acetonitrilo a una concentración final de 50% en las muestras. Las muestras recogidas se guardaron a -20°C hasta su análisis por HPLC o LC-MS.

50 Transporte basolateral a apical

Cada compuesto se testó en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y los apicales contenían 1,55 ml y 0,4 ml de TB, respectivamente, y la concentración estándar de las sustancias testadas era $10 \mu\text{M}$. Adicionalmente todas las soluciones de test y los tampones contenían 1% de DMSO. Antes del experimento, las placas de transporte se recubrieron

ron previamente con medio de cultivo que contenía 10% de suero durante 30 minutos a fin de evitar la fijación inespecífica al material plástico.

5 Después de 21 a 28 días en cultivo sobre soportes de filtro, las células estaban listas para los experimentos de permeabilidad. Se retiró el medio de cultivo de los pocillos apicales y las inserciones se transfirieron a una fila de lavado (número 1) en una nueva placa sin inserciones (placa de transporte). La placa de transporte comprendía 3 filas de 4 pocillos. La fila 1 se designó "lavado" y la fila 3 era la "fila experimental". La placa de transporte se había preparado previamente con 1,5 ml de TB (pH 7,4) en la fila de lavado número 1 y con 1,55 ml de TB (pH 7,4), que incluía la sustancia de test, en la fila experimental número 3 (lado donante).

10 Se añadieron 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a las inserciones en la fila número 1 y las monocapas de células se equilibraron en el sistema tampón de transporte durante 30 minutos, a 37 °C en un agitador de sacudidas Polymix. Después de la equilibración al sistema tampón, se midió el valor TEER en cada pocillo mediante un instrumento de pabillo EVOM.

15 Se retiró el tampón de transporte (TB, pH 6,5) del lado apical y la inserción se transfirió a la fila 3, después de lo cual se añadieron a las inserciones 400 µl de TB nuevo, pH 6,5. Después de 30 minutos se retiraron del pocillo apical (receptor) 250 µl y se reemplazaron por tampón de transporte nuevo. Se retiraron después de ello muestras de 250 µl y se reemplazaron por tampón de transporte nuevo cada 30 minutos hasta el final del experimento al cabo de 120 minutos, y finalmente se midió un post-valor de TEER al final del experimento. Se tomó una muestra de 25 µl del compartimiento basolateral (donante) después de ~2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representaban muestras donantes del comienzo y el final del experimento.

20 A todas las muestras recogidas se añadió acetonitrilo a una concentración final de 50% en las muestras. Las muestras recogidas se guardaron a -20°C hasta su análisis por HPLC o LC-MS.

25 Determinación de la fracción acumulativa absorbida, FA_{cum} , en función del tiempo. Se calculó FA_{cum} por:

$$FA_{cum} = \sum \frac{C_{RI}}{C_{DI}}$$

30 donde C_{RI} es la concentración de receptor al final del intervalo i , y C_{DI} es la concentración de donante al comienzo del intervalo i . Debe obtenerse una relación lineal. La determinación de los coeficientes de permeabilidad (P_{app} , cm/s) se calculó por:

$$P_{app} = \frac{(k \cdot V_R)}{(A \cdot 60)}$$

35 donde k es la tasa de transporte (min^{-1}) definida como la pendiente obtenida por regresión lineal de la fracción acumulativa absorbida (FA_{cum}) en función del tiempo (min), V_R es el volumen en la cámara receptora (ml), y A es el área del filtro (cm^2).

Tabla 2: Compuestos de referencia

Categoría de absorción en el hombre	Marcadores	% Absorción en el hombre
TRANSPORTE PASIVO		
Bajo (0-20%)	Manitol Metotrexato	16 20
Moderado (21-75%)	Aciclovir	30
Alto (76-100%)	Propranolol Cafeína	90 100
TRANSPORTE ACTIVO		
Transportador de aminoácidos	L-Fenilalanina	100
EFLUJO ACTIVO		
PGP-MDR ¹	Digoxina	30

La tabla 3 siguiente muestra los resultados de permeabilidad (P_{app}) expresados en 10^{-6} cm/s para una selección representativa de compuestos de acuerdo con la invención cuando se testaron en el ensayo de permeabilidad arriba descrito.

5 Tabla 3

Compuesto No.	P_{app} (10^{-6} cm/s)
9	11
26	3,6
28	8,6
33	31

Ejemplo 8: Bloqueo metabólico *in vitro* de los inhibidores de la proteasa NS3/4a por ritonavir

Se testaron diferentes inhibidores de la proteasa NS3/4a en un experimento de bloqueo metabólico utilizando compuesto de test 3 μ M junto con ritonavir 10 μ M que actuaba como reforzante.

10 Se añadieron los compuestos de test y ritonavir a microsomas hepáticos humanos (concentración de proteínas 1 mg/ml) suspendidos en tampón de fosfato de potasio (pH = 7,4), para obtener concentraciones de la mixtura final de reacción de compuesto de test 3 μ M y ritonavir 10 μ M. En las reacciones paralelas sin reforzante, no se añadió ritonavir. Se utilizaron microsomas hepáticos humanos hervidos para los experimentos en blanco. Después de la adición (en una ratio 1:3) de una mixtura de cofactores constituida por β -nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (β -NADP, 0,5 mg/ml, 653,2 μ M), D-glucosa-6-fosfato (2 mg/ml, 7,1 mM), glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (1,5 U/ml) en NaHCO_3 al 2%, la mixtura de reacción se incubó a 37 °C durante 30 o 120 minutos, después de lo cual se paró la reacción por aumento de la temperatura a 95°C. Las concentraciones de los compuestos de test se determinaron utilizando HPLC-MS.

20 Los resultados se resumen a continuación en la tabla 4. Los valores son porcentajes de compuesto de test detectados después de los tiempos de incubación indicados en comparación con la concentración inicial de compuesto de test. Cada valor es la media de los resultados de dos experimentos independientes.

25 Tabla 4

Compuesto No.	30'		120'	
	% Compuesto Detectado		% Compuesto Detectado	
	Sin Reforzante	Ritonavir	Sin Reforzante	Ritonavir
16	71	93	20	102
9	44	88	0	100

El experimento muestra un bloqueo prácticamente completo de la metabolización del compuesto de test (3 μ M) por adición de ritonavir 10 μ M.

30 **Ejemplo 9: Efectos *in vivo* de ritonavir sobre la farmacocinética del Compuesto n° 9 en el perro**

Se investigaron la farmacocinética oral del Compuesto n° 9 en perros Beagle macho después de una sola dosis a 10 mg/kg, utilizando una formulación en 50% PEG400/agua y la influencia del "reforzamiento" con 10 mg/kg de ritonavir.

35 Seis perros Beagle macho (peso corporal 8-10 kg) se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de 3 animales (reforzados y no reforzados). Se incluyeron animales de control sin tratar o tratados con vehículo. Antes de la dosificación, los animales se mantuvieron en ayunas durante una noche (periodo de aprox. 12 horas de ayuno) y no recibieron alimento alguno antes de la dosificación hasta 6 horas después de la dosificación. Durante todo el experimento estuvo disponible agua para beber.

40 Los perros del grupo sin reforzante recibieron una sola dosis oral de 10 mg/kg de Compuesto n° 9, formulado como una preparación de 5 mg/ml de 50% PEG400/agua. Los perros del grupo reforzado recibieron una sola cápsula blanda de Norvir® (ritonavir, 100 mg/cápsula), aproximadamente 30 minutos antes de la dosificación oral única con 10 mg/kg de Compuesto n° 9. Las formulaciones de fármaco se administraron por sonda esofágica oral, utilizando un tubo gástrico.

45 Se recogió una muestra de sangre 3 ml al cabo de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosificación del Compuesto n° 9. Se determinaron las concentraciones en plasma utilizando HPLC-

MS. Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación, expresados como números de veces de cambio en el parámetro farmacocinético del grupo reforzado comparado con el grupo sin reforzante.

Tabla 5

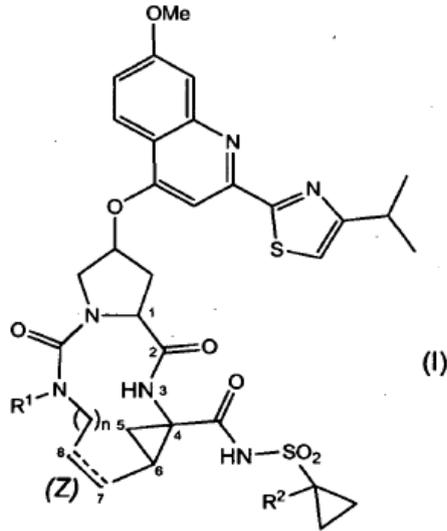
Parámetro farmacocinético	Aumento en número de veces en el compuesto n° 9 cuando se reforzó con ritonavir
C_{max}	31
AUC	55

5

Estos resultados demuestran que ritonavir mejora sustancialmente la farmacocinética del Compuesto n° 9 en el perro, con exposiciones globales expresadas como AUC que aumentan 55 veces.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula



5

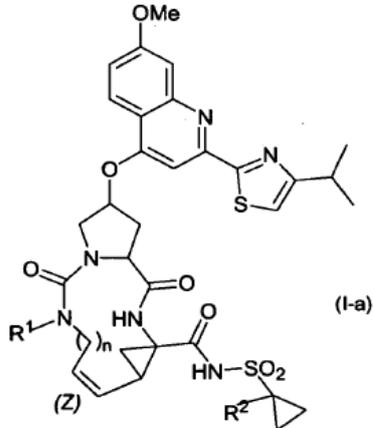
y los *N*-óxidos, sales, y estereoisómeros del mismo, en donde la línea de trazos representa un enlace doble opcional entre los átomos C7 y C8;

R¹ es hidrógeno o C₁₋₆alquilo;

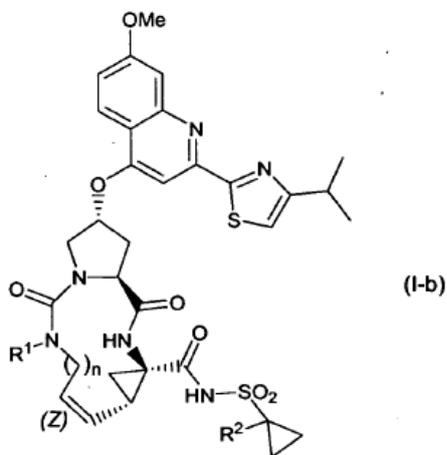
R² es hidrógeno o C₁₋₆alquilo; y

10 **n** es 3, 4, 5, ó 6.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula (I-a):

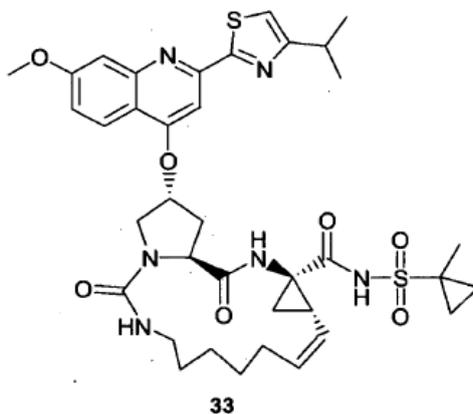


- 15 3. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el compuesto tiene la fórmula (I-b):



- 5
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde n es 4 o 5.
5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R¹ es hidrógeno o metilo.
6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R² es hidrógeno.
- 10 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R² es metilo.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto se selecciona de

15

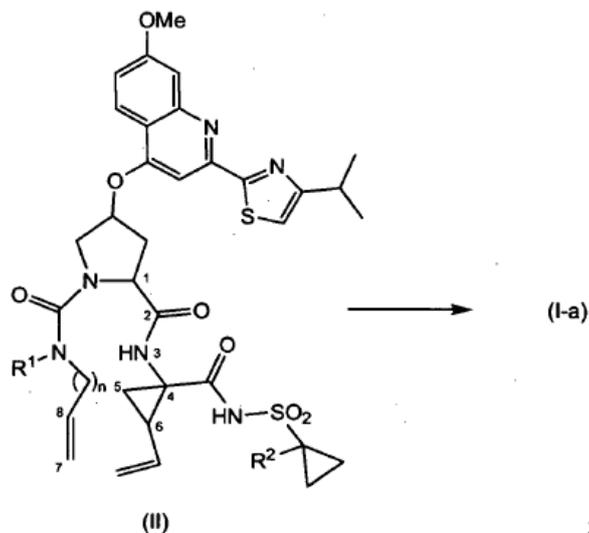


- 20 9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 distinto de un N-óxido, o sal.
10. Una combinación que comprende
- (a) un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- 25 (b) ritonavir, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
11. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo, y como ingrediente activo una cantidad antiviralmente eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una combinación de acuerdo con la reivindicación 10.
- 30 12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una combinación de acuerdo con la reivindicación 10, para uso como medicamento.
- 35 13. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una combinación de acuerdo con la reivindicación 10, para la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación del HCV.

14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una cantidad eficaz de cada componente de la combinación de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en un método de inhibición de la replicación del HCV.

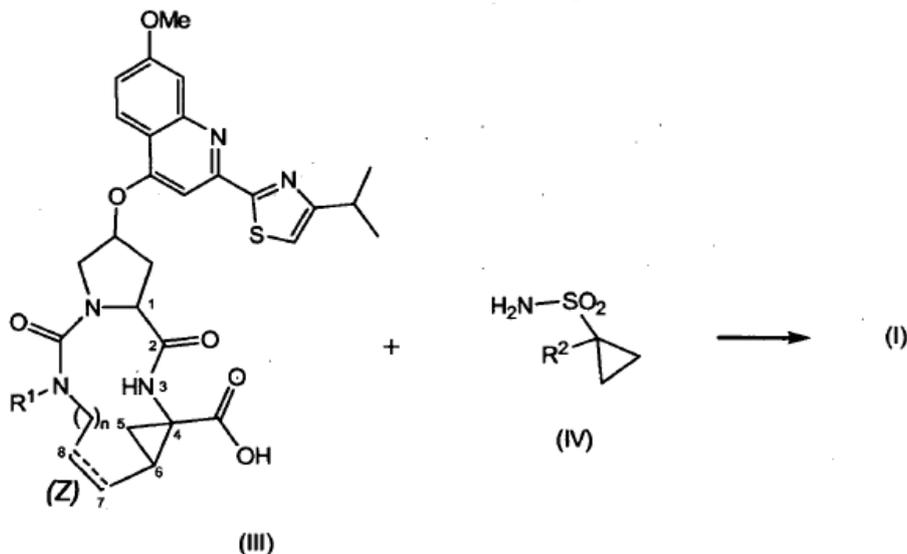
5 15. Un proceso para preparar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho proceso comprende:

10 (a) preparar un compuesto de fórmula (I) en donde el enlace entre C7 y C8 es un enlace doble, que es un compuesto de fórmula (I-a), como se define en la reivindicación 2, por formación de un enlace doble entre C7 y C8, en particular por una reacción de metátesis de olefinas, con ciclación concomitante para dar el macrociclo como se resume en el esquema de reacción siguiente:

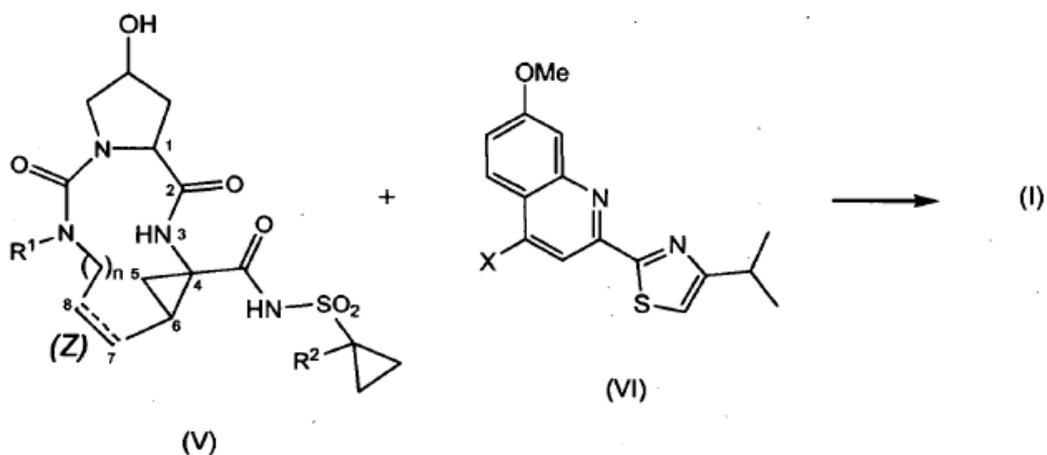


15 (b) convertir un compuesto de fórmula (I-a) en un compuesto de fórmula (I) en la cual el enlace entre C7 y C8 en el macrociclo es un enlace simple, es decir un compuesto de fórmula (I-b) como se define en la reivindicación 3, por una reducción del enlace doble C7-C8 en el compuesto de fórmula (I-a);

(c) hacer reaccionar una ciclopropilsulfonamida (IV) con un compuesto intermedio (III) por una reacción de formación de amida como se resume el esquema de reacción siguiente:

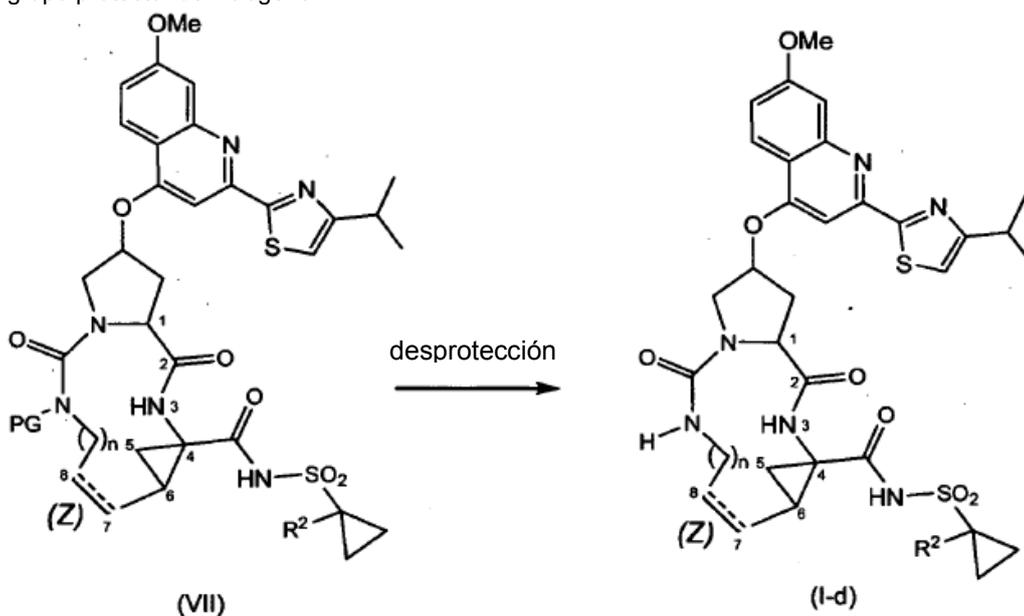


20 (d) eterificar un compuesto intermedio (V) con una quinoleína de fórmula (VI) como se resume el esquema de reacción siguiente:



donde X en (VI) representa hidroxilo o un grupo lábil; creación que, en particular, es una reacción de arilación en O en donde X representa un grupo lábil, o una reacción de Mitsunobu, en donde X es hidroxilo;

- 5 (e) preparar un compuesto de fórmula (I) en donde R¹ es hidrógeno, representándose dicho compuesto por (I-d), a partir de un compuesto intermedio correspondiente protegido en el nitrógeno (VII), en donde PG representa un grupo protector de nitrógeno:



- 10 (f) convertir compuestos de fórmula (I) unos en otros por una reacción de transformación de grupos funcionales, o
- 15 (g) preparar una forma de sal por reacción de la forma libre de un compuesto de fórmula (I) con un ácido o una base.