

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 548**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 417/12 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04759362 .9**

96 Fecha de presentación: **09.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1636208**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Inhibidores de serina proteasas, particularmente de la proteasa VHC NS3-NS4A**

30 Prioridad:
11.04.2003 US 412600
23.10.2003 US 513765 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
130 WAVERLY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139-4242, US

72 Inventor/es:
FARMER, Luc, J.;
PERNI, Robert, P.;
BHISSETTI, Govinda, Rao y
WILSON, Keith, P.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 548 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 de serina proteasas, particularmente de la proteasa VHC NS3-NS4a.

Referencia a solicitudes de patente relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos número 60/513.765, presentada el 23 de octubre de 2003, titulada "Inhibitors of Serine Proteases, Particularly HCVNS3-NS4A Protease". La presente solicitud también reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos número 10/412.600, presentada el 11 de abril de 2003, titulada "Inhibitors of Serine Proteases, Particularly HCV NS3-NS4A Protease".

Campo técnico de la invención

10 La presente invención se refiere a compuestos que inhiben la actividad de serina proteasas, particularmente la actividad de la serina proteasa NS3-NS4A del virus de la hepatitis C. Como tal, actúan interfiriendo con el ciclo de vida del virus de la hepatitis C y son también útiles como agentes antivirales. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos bien para uso *ex vivo* o bien para administración a un paciente que sufre de infección por VHC. La invención también se refiere a procedimientos para preparar los
15 compuestos y a procedimientos de tratar una infección por VHC en un paciente administrando una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención.

Antecedentes de la invención

20 La infección por virus de la hepatitis C es un problema médico humano imperioso. EL VHC está reconocido como el agente causante de la mayoría de los casos de hepatitis no-A, no-B, con una seroprevalencia humana estimada del 3 % globalmente [A. Alberti y cols., "Natural History of Hepatitis C," J. Hepatology, 31., (Supl. 1), páginas 17-24 (1999)]. Casi cuatro millones de personas puedan estar infectadas sólo en los Estados Unidos [M.J. Alter y cols., "The Epidemiology of Viral Hepatitis in the United States, Gastroenterol. Clin. North Am., 23, páginas 437-455 (1994); M. J. Alterar "Hepatitis C Virus Infection in the United States," J. Hepatology, 31., (Supl. 1), páginas 88-91 (1999)].

25 Tras la primera exposición al VHC sólo aproximadamente el 20 % de los individuos infectados desarrollan hepatitis clínicas agudas mientras que otros parecen resolver la infección espontáneamente. En casi el 70 % de los casos, sin embargo, el virus establece una infección crónica que persiste durante décadas [S. Iwanson, "The Natural Course of Chronic Hepatitis", FEMS Microbiology Reviews, 14, páginas. 201-204 (1994); D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C", J. Viral Hepatitis, 6, páginas 35-47 (1999)]. Esto normalmente da como resultado inflamación
30 del hígado recurrente y progresiva, que a menudo conduce a enfermedades más graves tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular [M.C. Kew, "Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma", FEMS Microbiology Reviews, 14, páginas 211-220 (1994); I. Saito y cols., "Hepatitis C Virus Infection is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma", Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87, páginas 6547-6549 (1990)]. Desafortunadamente, no hay tratamientos efectivos en líneas generales para la progresión debilitante de VHC crónica.

35 El genoma del VHC codifica una poliproteína de 3010-3033 aminoácidos [Q.L. Choo, y cols., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus" Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.: 88, páginas 2451-2455 (1991); N. Kato y cols., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87, páginas 9524-9528 (1990); A. Takamizawa y cols., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", J. Virol., 65, páginas 1105-1113 (1991)]. Se supone
40 que las proteínas de VHC no estructurales (NS) proporcionan la maquinaria catalítica esencial para la replicación vírica. Las proteínas NS se derivan por escisión proteolítica de la poliproteína [R. Bartenschlager et. y cols., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine- Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", J. Virol., 67, páginas 3835-3844 (1993); A. Grakoui y cols., "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites",
45 J. Virol., 67, páginas 2832-2843 (1993); A. Grakoui y cols., "Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", J. Virol., 67, páginas 1385-1395 (1993); L. Tomei y cols., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", J. Virol., 67, páginas 4017-4026 (1993)].

50 La proteína 3 NS (NS3) del VHC contiene una actividad serina proteasa que ayuda a la mayoría de las enzimas víricas y así se considera esencial para replicación vírica e infectividad. Se sabe que las mutaciones en la proteasa NS3 del virus de la fiebre amarilla disminuyen la infectividad vírica [Chambers, T.J. y cols., "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein", Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87, páginas 8898-8902 (1990)]. Se ha mostrado que los primeros 181 aminoácidos de NS3 (residuos 1027-1207 de la poliproteína vírica) contienen el dominio de la serina proteasa de NS3 que procesa todos los cuatro sitios más adelante en la cadena de la poliproteína de VHC [C. Lin y cols., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and
55 Processing Kinetics", J. Virol., 68, páginas 8147-8157 (1994)].

La serina proteasa NS3 de VHC y su cofactor asociado, NS4A, ayudan a procesar todas las enzimas víricas y así se consideran esenciales para la replicación vírica. Este procesamiento parece ser análogo a aquel llevado a cabo por la aspartil proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, que también está implicada en el procesamiento de enzimas víricas. Los inhibidores de la proteasa del VIH, que inhiben el procesamiento de proteínas víricas, son potentes agentes antivirales en el hombre, indicando que interrumpir esta fase del ciclo vital vírico da como resultado agentes terapéuticamente activos. En consecuencia la serina proteasa NS3 de VHC es también un objetivo atractivo para descubrimiento de fármacos.

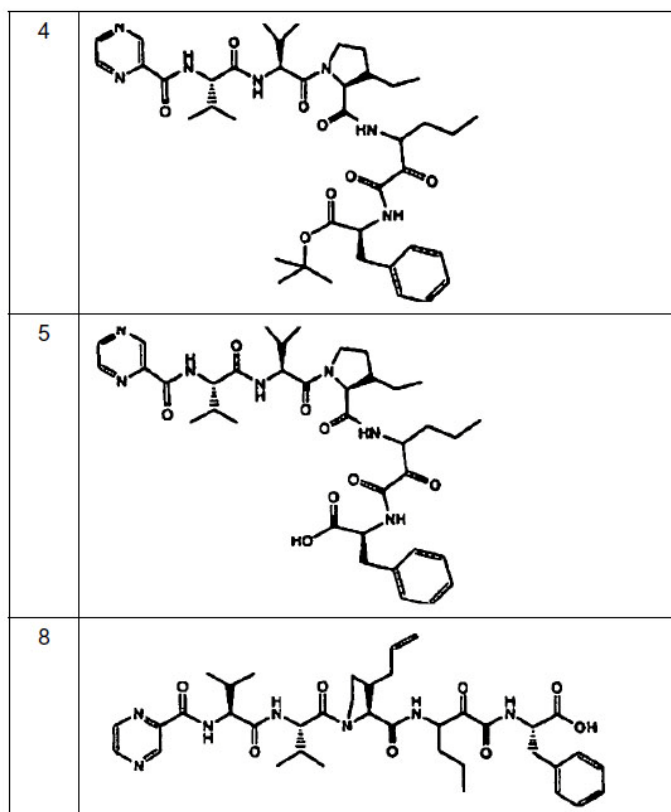
Además, la comprensión actual del VHC no ha conducido a ningún otro agente o tratamiento anti-VHC satisfactorio. Hasta recientemente, el único tratamiento para la enfermedad de VHC era el tratamiento de interferón. Sin embargo, los interferones tienen efectos secundarios significativos [M. A. Wlaker y cols., "Hepatitis C Virus: An Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, páginas 518-29 (1999); D. Moradpour y cols., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C," Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, páginas 1199-1202 (1999); H. L. A. Janssen y cols. "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis", J. Hepatol., 21, páginas 241-243 (1994); P.F. Renault y cols., "Side Effects of Alpha Interferon", Seminars in Liver Disease, 9, páginas 273-277. (1989)] e inducen la remisión a largo plazo en sólo una fracción (-25 %) de los casos (O. Wieland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, páginas 279-288 (1994)]. Las recientes introducciones de las formas pegiladas de interferón (PEG-Intron® y Pegasys®) y la terapia de combinación de ribavirina e interferón pegilado (Rebetrol®) han resultado en sólo mejoras modestas en las tasas de remisión y sólo reducciones parciales de los efectos secundarios. Además, las perspectivas de vacunas eficaces anti-VHC siguen siendo inciertas.

Así, existe la necesidad de terapias contra el VHC más eficaces. Tales inhibidores tendrían potencial terapéutico como inhibidores de proteasa, particularmente como inhibidores de serina proteasa y más particularmente como inhibidores de proteasa NS3 de VHC. Específicamente, tales compuestos pueden ser útiles como agentes antivirales, particularmente como agentes anti-VHC.

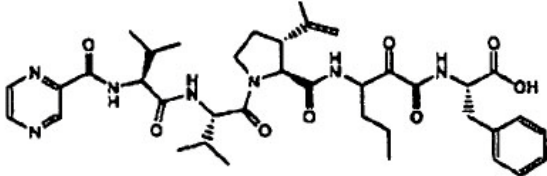
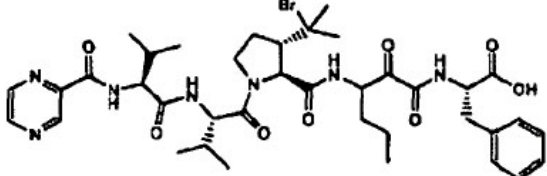
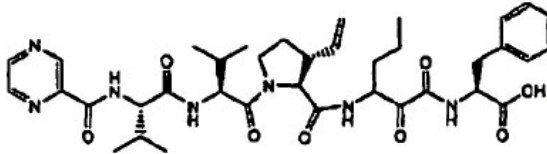
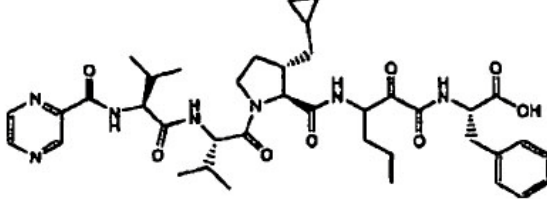
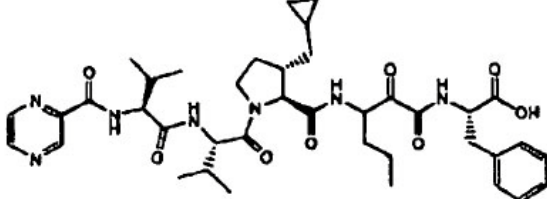
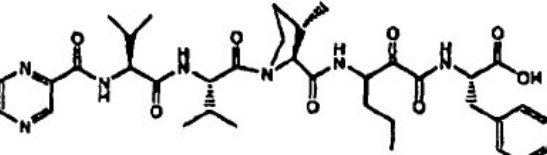
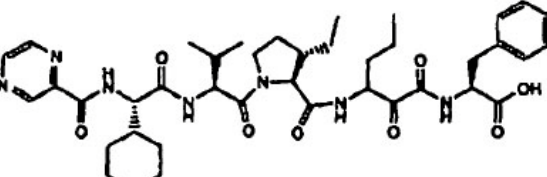
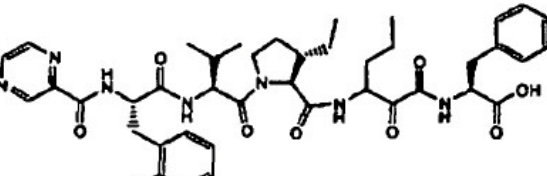
El documento WO 98/17679 A1 describe inhibidores de serina proteasas, particularmente inhibidores de proteasas NS3 del virus de la hepatitis C. El documento WO 01/40262 A1 describe inhibidores de alfa-cetoamida de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. El documento WO 01/74768 A2 describe inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. El documento WO 02/08244 A2 describe péptidos novedosos como inhibidores de serina proteasa NS3 del virus de la hepatitis C.

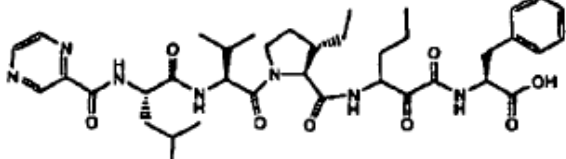
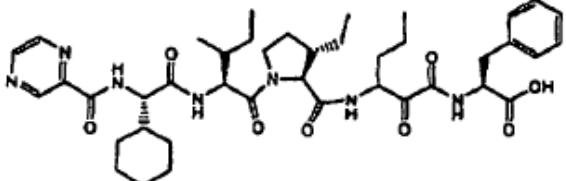
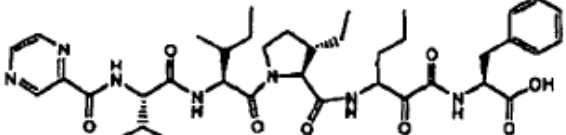
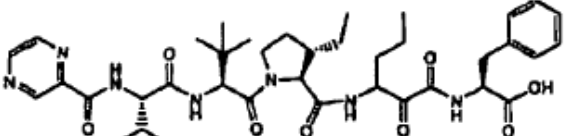
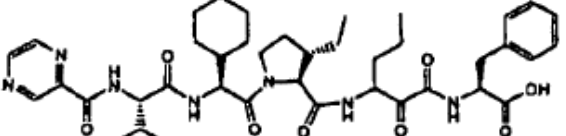
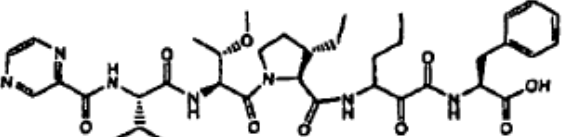
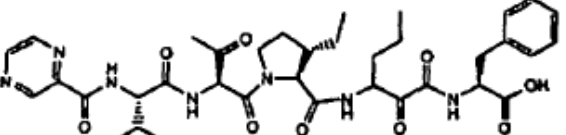
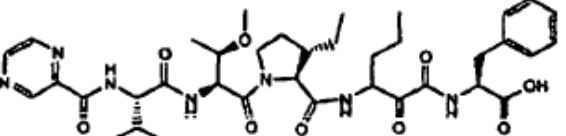
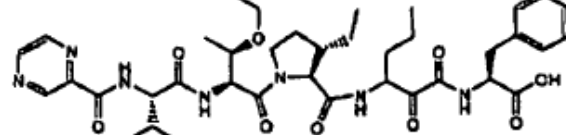
30 Sumario de la invención

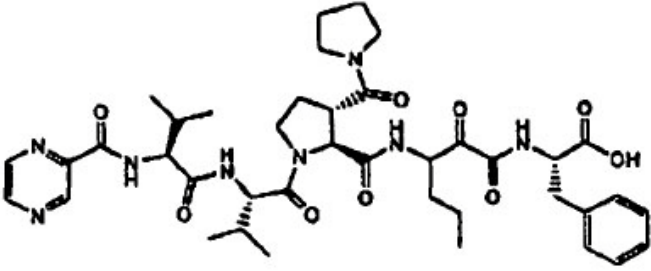
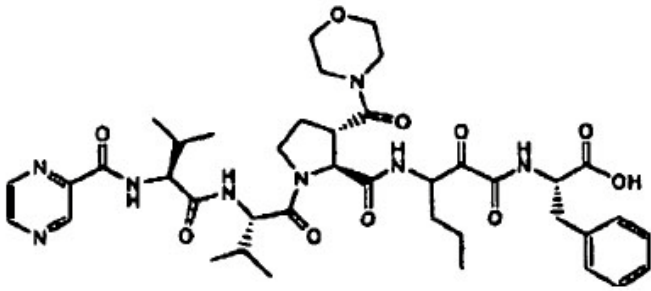
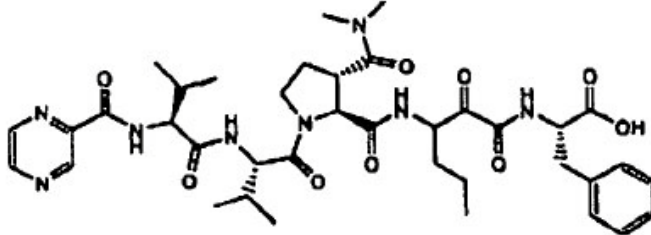
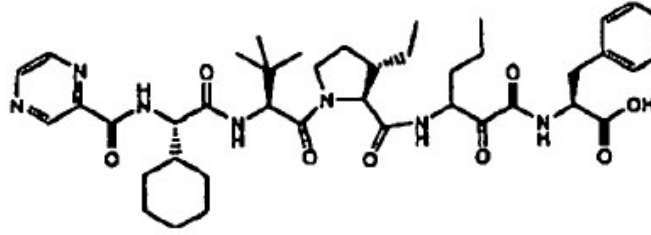
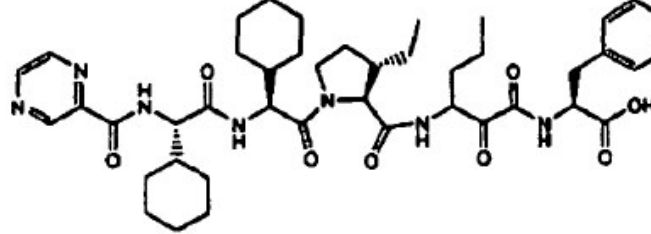
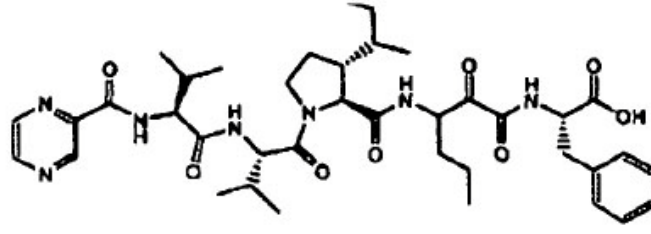
La presente invención proporciona un compuesto seleccionado de:



9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

17	
18	
19	
20	
21	
22	
26	
27	

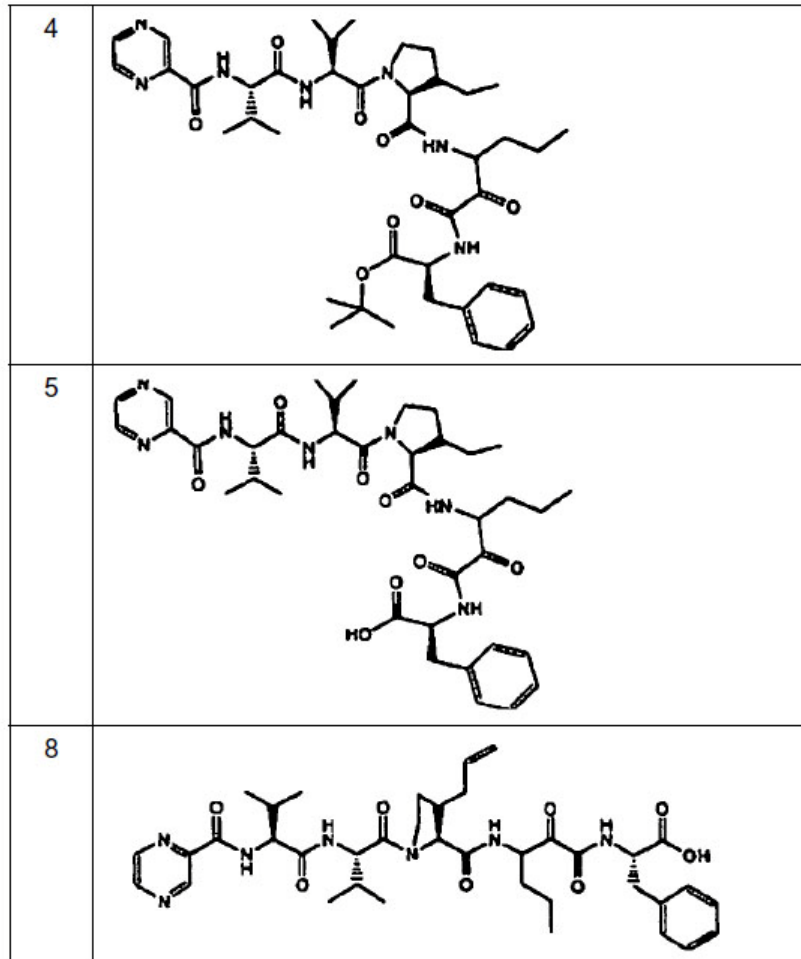
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	

37	
38	
40	
41	
42	
57	

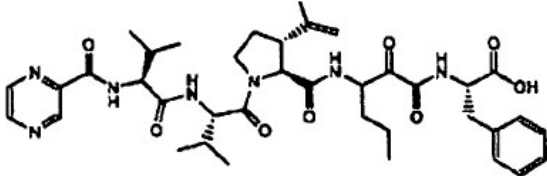
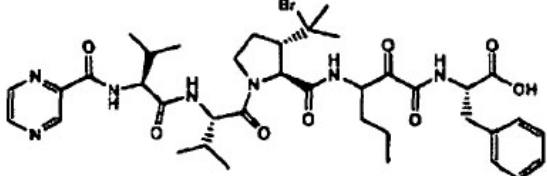
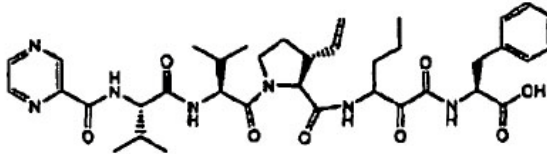
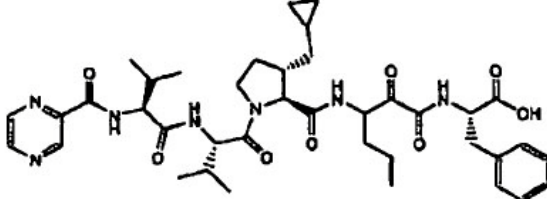
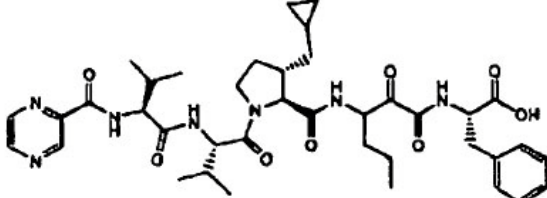
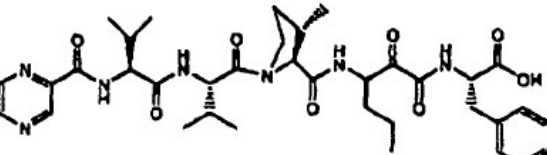
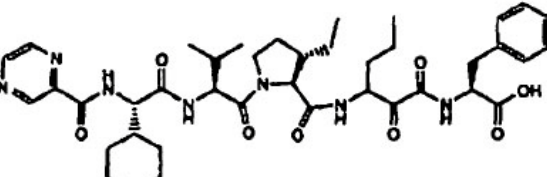
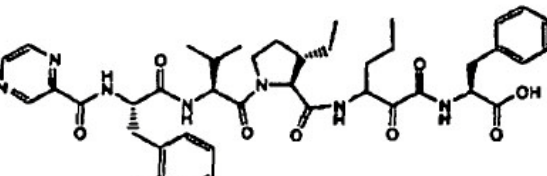
La invención también se refiere a procedimientos para preparar los compuestos anteriores y a composiciones que comprenden los compuestos anteriores y al uso de los mismos. Tales composiciones se pueden usar para pretratar dispositivos invasivos para insertarse en un paciente, para tratar muestras biológicas, tales como sangre, antes de administración a un paciente y para administración directa a un paciente. En cada caso, la composición se usará para inhibir la replicación del VHC y para disminuir el riesgo de o la gravedad de la infección por VHC.

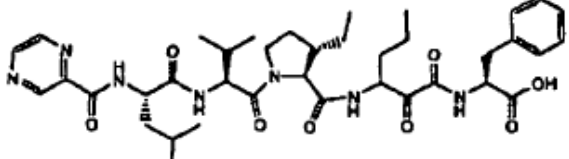
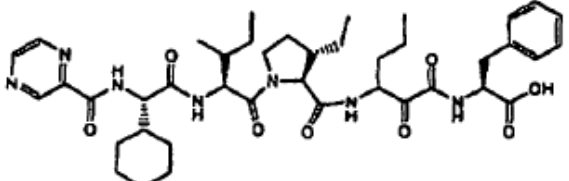
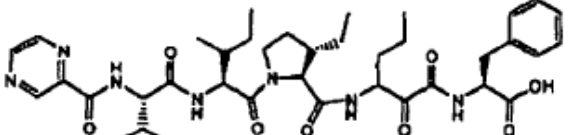
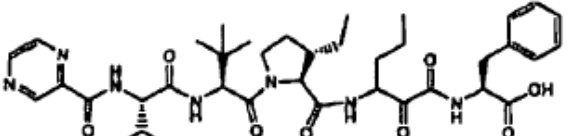
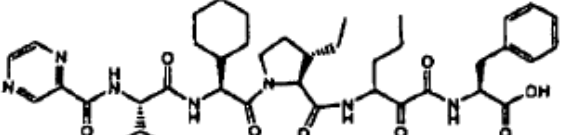
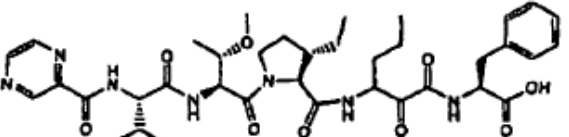
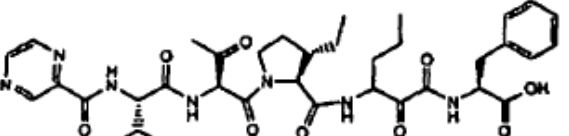
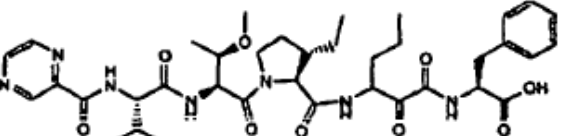
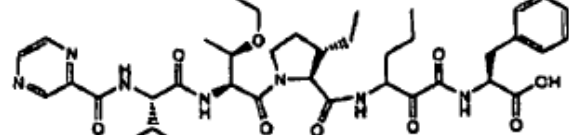
Descripción detallada de la invención

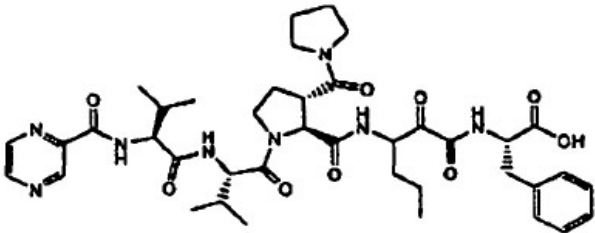
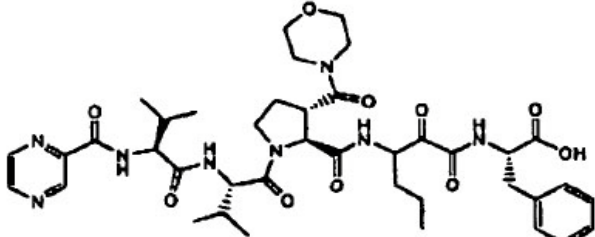
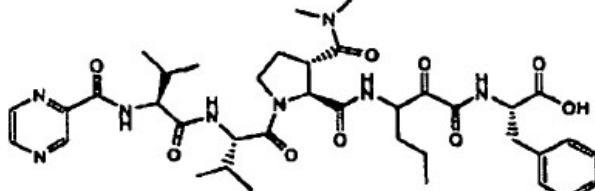
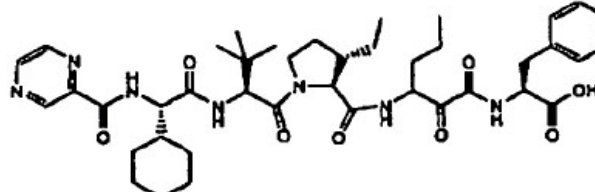
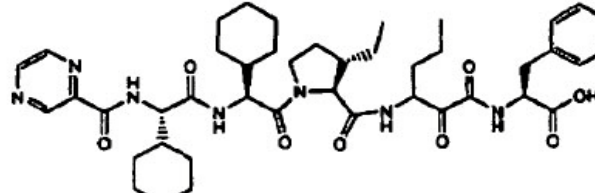
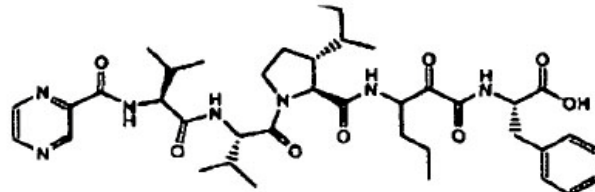
La presente invención proporciona un compuesto seleccionado de:



9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

17	
18	
19	
20	
21	
22	
26	
27	

28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	

37	
38	
40	
41	
42	
57	

Definiciones

- 5 El término "arilo" como se usa en el presente documento quiere decir un sistema de anillo aromático carbocíclico monocíclico o bicíclico. Fenilo es un ejemplo de un sistema de anillo aromático monocíclico. Los sistemas de anillo bicíclico aromático incluyen sistemas en los que ambos anillos son aromáticos, por ejemplo, naftilo y sistemas en los que sólo uno de los dos anillos es aromático, por ejemplo, tetralina. Se entiende que como se usa en el presente documento, el término "(C6-C10)-acil-" incluye cualquiera de un anillo aromático carbocíclico monocíclico o bicíclico de C6, C7, C8, C9 y C10.

El término "heterociclilo" como se usa en el presente documento quiere decir un sistema de anillo no aromático monocíclico o bicíclico que tiene 1 a 3 heteroátomos o grupos heteroatómicos en cada anillo seleccionado de O, N, NH, S, SO, SO₂ en un reordenamiento químicamente estable. En una realización de sistema de anillo no aromático bicíclico de "heterociclilo" uno o ambos anillos pueden contener dicho heteroátomo o dichos grupos heteroatómicos. Se entiende que como se usa en el presente documento, el término "(C5-C10)-heterociclii-" incluye uno cualquiera de un sistema de anillo no aromático monocíclico o bicíclico C5, C6, C7, C8, C9 y C10 que tiene 1 a 3 heteroátomos o grupos heteroatómicos en cada anillo seleccionados de O, N, NH y S en un reordenamiento químicamente estable.

El término "heteroarilo" como se usa en el presente documento quiere decir un sistema de anillo aromático monocíclico o bicíclico que tiene 1 a 3 heteroátomos o grupos heteroatómicos en cada anillo seleccionado de O, N, NH y S en un reordenamiento químicamente estable. En un sistema de anillo bicíclico aromático tal de realización de "heteroarilo":

- uno o ambos anillos pueden ser aromáticos; y

- uno o ambos anillos pueden contener dicho heteroátomo o grupos heteroatómicos. Se entiende que como se usa en el presente documento, el término "(C5-C10)-heterociclii-" incluye uno cualquiera de un sistema de anillo aromático monocíclico o bicíclico C5, C6, C7, C8, C9 y C10 que tiene 1 a 3 heteroátomos o grupos heteroatómicos en cada anillo seleccionados de O, N, NH y S en un reordenamiento químicamente estable.

El término "alifático" como se usa en el presente documento quiere decir un alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal. Se entiende que como se usa en el presente documento, el término "(C1-C12)-alifático-" incluye una cualquiera de una cadena de alquilo lineal o ramificada de C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11 y C12 de átomos de carbono. Se entiende también que las realizaciones de alqueno o alquino necesitan al menos dos átomos de carbono en la cadena alifática. El término "cicloalquilo o cicloalqueno" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico condensado o bicíclico enlazado que no es aromático. Los anillos de cicloalqueno tienen una o más unidades de insaturación. Se entiende también que como se usa en el presente documento, el término "(C3-C10)-cicloalquil- o -cicloalqueno-" incluye uno cualquiera de un anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico condensado o bicíclico enlazado C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10. Los grupos cicloalquilo preferidos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, norbornilo, adamantilo y decalinilo.

La expresión "reordenamiento químicamente estable" como se usa en el presente documento se refiere a una estructura de compuesto que vuelve al compuesto suficientemente estable para permitir elaboración y administración a un mamífero por procedimientos conocidos en la técnica. Típicamente tales compuestos son estables a una temperatura de 40 °C o menos, en la ausencia de humedad o de otra condición reactiva químicamente, durante al menos una semana.

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos y así pueden aparecer como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, mezclas diastereómeras y diastereómeros individuales. Todas las formas isómeras tales de estos compuestos están expresamente incluidas en la presente invención. Cada carbono estereogénico puede ser de la configuración R o S.

En otra realización, los compuestos de la presente invención tienen la estructura y la estereoquímica representada en los compuestos de la invención.

Cualesquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente, incluyendo aquellas realizaciones en las especies anteriores, pueden combinarse para producir una realización preferida de la presente invención.

Como puede apreciar un experto, los esquemas de síntesis mostrados no se desean para comprender una lista extensiva de todos los medios por los que los compuestos descritos y reivindicados en esta solicitud se pueden sintetizar. Otros esquemas equivalentes, que serán fácilmente patentes para el químico orgánico experto, pueden usarse alternativamente para sintetizar diversas partes de la molécula según se ilustra por los esquemas generales dados más adelante. Adicionalmente, las diversas etapas de síntesis descritas anteriormente pueden llevarse a cabo en una secuencia u orden para dar los compuestos deseados. Otros esquemas equivalentes, que serán fácilmente patentes para el químico orgánico experto, pueden usarse alternativamente para sintetizar diversas partes de la molécula según se ilustra por los esquemas generales dados más adelante y los ejemplos preparativos que siguen.

Las abreviaturas que se usan en los esquemas, preparaciones y ejemplos que siguen son:

DCM: diclorometano

THF: tetrahidrofurano

DMF: N,N-dimetilformamida

EtOAc: acetato de etilo

AcOH: ácido acético

- NMM: N-metilmorfolina
 NMP: N-metilpirrolidinona
 EtOH: etanol
 t-BuOH: terc-butanol
- 5 Et₂O: éter dietílico
 DMSO: dimetilsulfóxido
 DCCA: ácido dicloroacético
 DIEA: diisopropiletilamina
 MeCN: acetonitrilo
- 10 TFA: ácido trifluoroacético
 DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
 DEAD: azodicarboxilato de dietilo
 HOBt: hidrato de 1-hidroxibenzotriazol
 HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
- 15 EDC: clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
 Boc: terc-butiloxycarbonilo
 Boc₂O: dicarbonato de di-terc-butilo
 Cbz: benciloxycarbonilo
 Cbz-Cl: cloroformiato de bencilo
- 20 Fmoc: 9-fluorenil-metiloxycarbonilo
 SEM: sililetoximetilo
 TBAF: fluoruro de tetrabutylamonio
 Chg: ciclohexilglicina
 t-BG: terc-butilglicina
- 25 mCBPA: ácido 3-cloroperoxibenzoico
 DAST: trifluoruro de (dietilamino)azufre
 TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi, radical libre
 PyBOP: hexafluorofosfato de tris(pirrolidino)bromofosfonio
 TBTU o HATU: tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
- 30 DMAP: 4-dimetilaminopiridina
 AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrilo
 ta o TA: temperatura ambiente
 ON: durante toda una noche
 ND: no determinado
- 35 EM: espectrometría de masas
 CL: cromatografía líquida

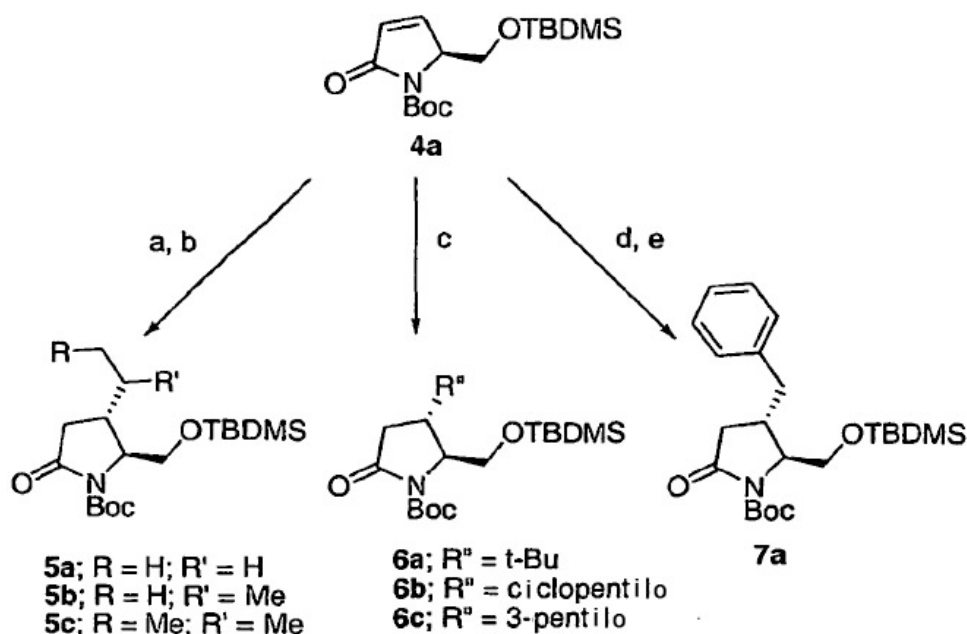
Metodología de síntesis general:

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse en general por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Los esquemas 1-6, dados más adelante, ilustran las vías de síntesis para los compuestos de la presente invención. Otros esquemas equivalentes, que serán fácilmente patentes para el químico orgánico experto, pueden usarse alternativamente para sintetizar diversas partes de la molécula según se ilustra por los esquemas generales dados más adelante y los ejemplos preparativos que siguen.

5

Esquema 1:

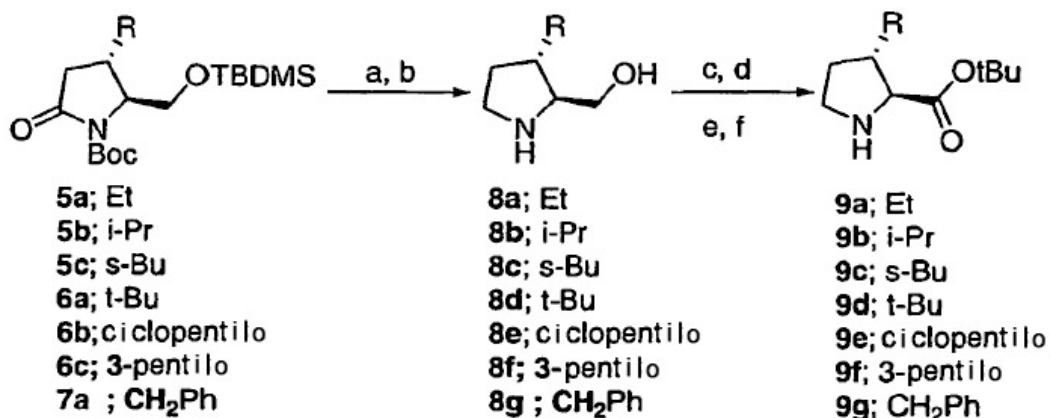


10

Esquema 1. (a) 2-vinilo, 2-propenilo o 2-butenil-MgBr, CuBr-DMS, éter, -20 °C después TMSCl, -78 °C (al 65 %, al 73 %, al 84 %); (b) Pd-C al 10 %, H₂, 101.325 pascales (1 atm), EtOH (al 90 %, al 92 %, al 89 %) (c) R''ZnBr, THF, -30 °C, BF₃OEt₂ después TMSCl (al 64 %, al 40 %, al 37 %); (d) PhCH(Li)SPh, BuLi, TMEDA, -78 °C (al 45 %); (e) Ra-Ni, acetona/agua (1:1), reflujo, 12 h (al 83 %).

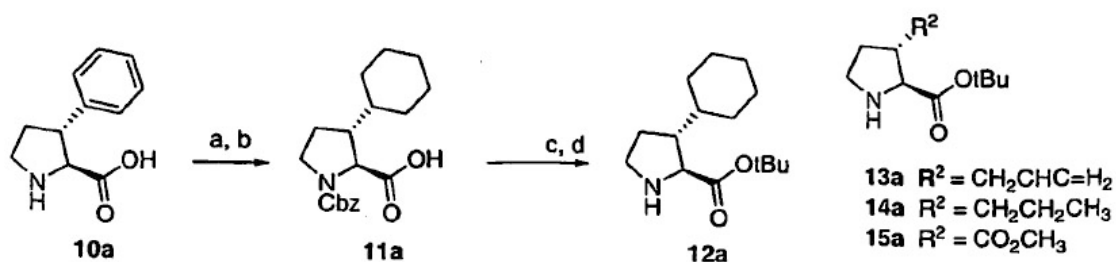
15

Esquema 2:



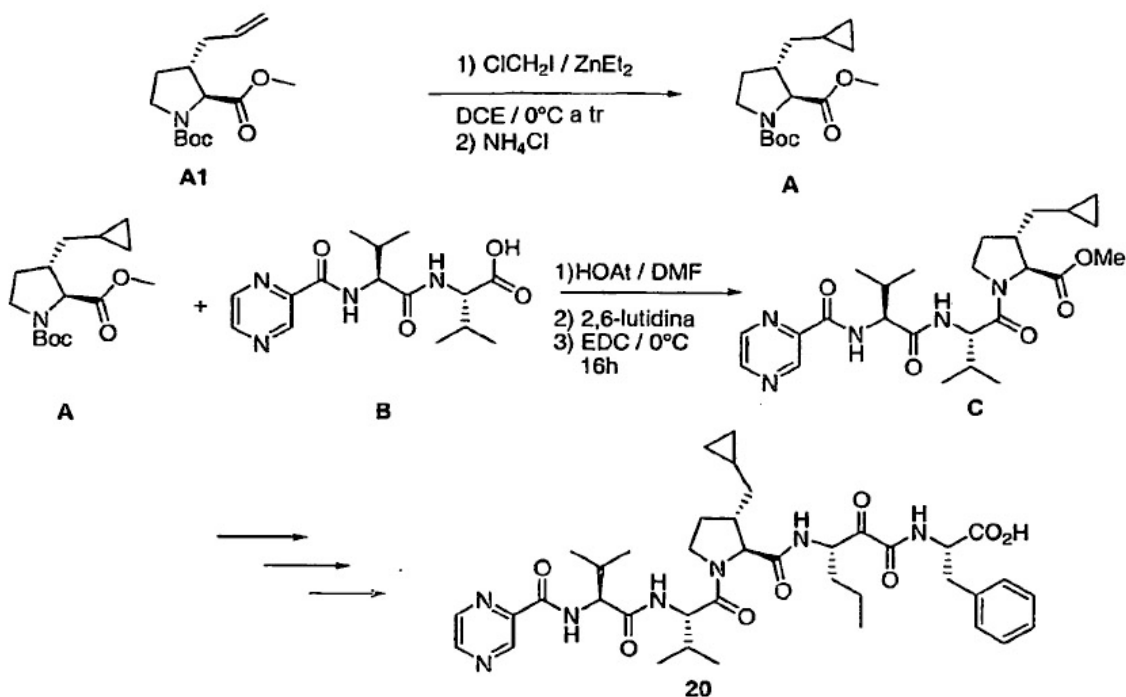
Esquema 2. (a) gas de HCl, EtOAc, -20 °C (al 80 %-90 %); (b) LAH, THF, reflujo (al 85 %-90 %); (c) CbzCl, K₂CO₃, THF:H₂O (1:1) (al 60 %-85 %); (d) Jones, acetona, (al 70 %-80 %); (e) isobutileno, H₂SO₄ cat., DCM (al 67 %-85 %); (f) Pd-C 10 %, H₂, 101.325 pascales (1 atm), EtOAc (al 90 %-95 %).

5 **Esquema 3:**

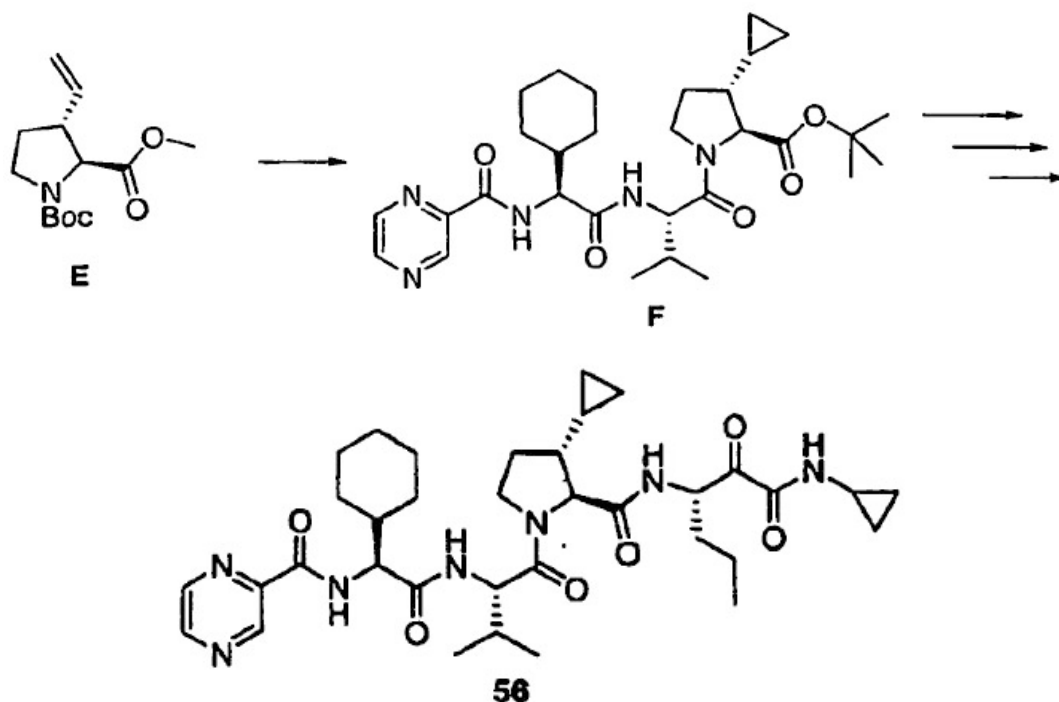
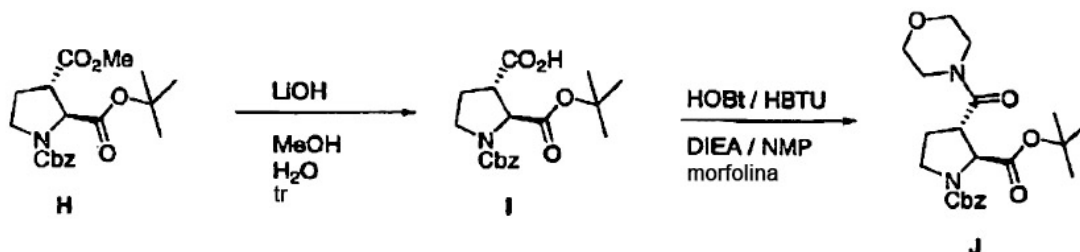


10 **Esquema 3.** (a) PtO₂, EtOH/AcOH/H₂O (7/2/1), H₂, 344737,95 pascales (50 psi); (b) CbzCl, Na₂CO₃, acetona:H₂O (1:1) (al 90 %, dos etapas); (c) isobutileno, H₂SO₄ cat., CH₂Cl₂; (d) Pd-C al 10 %, H₂, 101.325 pascales (1 atm), EtOH (al 84 %, dos etapas).

Esquema 4:



15

Esquema 5:**Esquema 6:**

5 El esquema 1-6 anterior proporciona rutas de síntesis para la preparación de los compuestos de la presente invención. Muchos de los derivados de prolina inicial se puede adquirir comercialmente de los proveedores conocidos por los expertos en la técnica. El intermedio A1 se puede preparar de acuerdo con el procedimiento descrito en J. Med. Chem. 39, p. 2367 (1996).

10 Aunque ciertas realizaciones se representan y se describen a continuación, se apreciará que los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en general anteriormente usando materiales de partida apropiados generalmente disponibles para alguien de habilidad normal en la técnica.

15 Otra realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con otra realización, el compuesto de la invención está presente en una cantidad eficaz para disminuir la carga vírica en una muestra o en un paciente, en el que dicho virus codifica una serina proteasa necesaria para el ciclo de vida vírico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Si las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se utilizan en estas composiciones, esas sales se derivan preferentemente de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Incluidas entre tales sales de ácidos están las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, sulfonato de benceno, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentano-propionato, digluconato, dodecilsulfato,

5 etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y sales de potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y sales de magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y así sucesivamente.

10 Además, los grupos que contienen nitrógeno básicos pueden cuaternizarse con tales agentes como haluros de alquilo inferiores, tales como cloruro de metilo, de etilo, de propilo y de butilo, bromuros y yoduros; sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, sulfatos de dietilo y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y de fenetilo y otros. Los productos solubles o dispersables en agua o en aceite se obtienen de este modo.

15 Los compuestos utilizados en las composiciones y procedimientos de la presente invención también pueden estar modificados por funcionalidades apropiadas que se añaden para mejorar propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones se conocen en la técnica y e incluyen aquellas que incrementan penetración biológica dentro de un sistema biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), incrementan la disponibilidad oral, incrementan solubilidad para permitir administración por inyección, alteran metabolismo y alteran la velocidad de excreción.

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógenofosfato disódico, hidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

25 Según otra realización, las composiciones de la presente invención se formulan para administración farmacéutica a un mamífero. En otra realización, las composiciones de la presente invención se formulan para la administración farmacéutica a un ser humano.

30 Tales composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente, por pulverizador de inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o por medio de un reservorio implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intra-articulares, intra-sinoviales, intraesternales, intratecales, intrahepáticas, intralesionales e intracraneales. En otra realización, las composiciones se administran oralmente o intravenosamente.

35 Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención puede ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o di- glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de productos inyectables, como son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones de aceite o suspensiones pueden contener también un diluyente de alcohol de cadena larga o dispersante, tales como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la elaboración de un sólido, líquido u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables pueden usarse también para los propósitos de formulación.

55 Los niveles de dosificación de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos inhibidores de proteasa descritos en el presente documento son útiles en una monoterapia para la prevención y tratamiento de enfermedad mediada por antivirico, particularmente por anti-VHC. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o de forma alternativa, como una infusión continua. Dicha administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. La preparación contendrá desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 95 % de

compuesto activo (p/p). En otra realización, tales preparaciones contienen desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 80 % de compuesto activo.

5 Cuando las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos, tanto el compuesto como el agente adicional deberían estar presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 100 % y en otra realización entre aproximadamente 10 a 80 % de la dosificación administrada normalmente en un régimen de monoterapia.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse oralmente en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no está limitada a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden típicamente. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas se requieren para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir también ciertos agentes edulcorantes, 15 aromatizantes o colorantes.

Alternativamente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en forma de supositorios para administración rectal. Éstos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse tópicamente, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto gastrointestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

25 La aplicación tópica para el tracto gastrointestinal inferior puede realizarse en una formulación de supositorio rectal (véase más adelante) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden usar parches tópicamente transdérmicos.

30 Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

35 Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, estéril de pH ajustado, o, preferentemente, como soluciones en solución salina isotónica, estéril de pH ajustado, bien con o bien sin un conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada, tal como vaselina.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar también por aerosol o inhalación nasal. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes adecuados.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración oral.

45 En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente otro agente, incluyendo un inhibidor de citocromo P-450. Tales inhibidores del citocromo P-450 incluyen, pero no se limitan a, ritonavir.

50 En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente otro agente antivírico, incluyendo un agente anti-VHC. Tales agentes antivirales útiles incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, tales como α -, β -, y γ -interferones, compuestos de interferón- α derivados pegilados y timosina; otros agentes antivirales, tales como ribavirina, amantadina y telbivudina; otros inhibidores de proteasas de hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de objetivos en el ciclo de vida del VHC, incluyendo pero no limitados a, inhibidores de helicasas y de polimerasas; inhibidores de entrada de ribosoma interno, inhibidores víricos de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, VX-497 y otros inhibidores de IMPDH descritos en Patentes de los Estados Unidos 5.807.876 y 6.498.178, ácido micofenólico y derivados de los mismos); inhibidores del citocromo P-450, tales como ritonavir, o combinaciones de cualquiera de los anteriores. 55

Después de la mejora de una afección del paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención, si es necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, como una función de los síntomas, hasta un nivel en que la condición mejorada se mantenga cuando los síntomas se hayan aliviado al nivel deseado, el tratamiento debería cesar. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente en una base a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

También debería entenderse que un determinado régimen de dosificación y tratamiento para cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y el criterio del médico que administra el tratamiento y la gravedad de la enfermedad particular a tratarse. La cantidad de ingredientes activos también dependerá del compuesto particular descrito y de la presencia o ausencia y de la naturaleza del agente antiviral adicional en la composición.

Según otra realización, la invención proporciona el uso de una composición farmacéuticamente aceptable de la presente invención para tratar un paciente infectado con un virus caracterizada por una serina proteasa codificada víricamente que es necesaria para el ciclo de vida del virus. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar un paciente que sufre de una infección por VHC. Tal tratamiento puede erradicar por completo la infección vírica o reducir la gravedad de la misma. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar un paciente que sufre de una infección por VHC en el que el paciente es un ser humano.

Adicionalmente, a dicho paciente se puede administrar un agente antivírico preferentemente un agente anti-VHC. Tales agentes antivirales útiles incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, tales como α -, β -, y γ -interferones, compuestos de interferón- α derivados pegilados y timosina; otros agentes antivirales, tales como ribavirina, amantadina y telbivudina; otros inhibidores de proteasas de hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de objetivos en el ciclo de vida del VHC, incluyendo inhibidores de helicasas y de polimerasas; inhibidores de entrada de ribosoma interno, inhibidores víricos de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, VX-497 y otros inhibidores de IMPDH descritos en Patentes de los Estados Unidos 5.807.876 y 6.498.178, ácido micofenólico y derivados de los mismos); inhibidores del citocromo P-450, tales como ritonavir, o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Tal agente adicional se puede administrar a dicho paciente como parte de una única forma de dosificación que comprende un compuesto de la presente invención y un agente antiviral adicional. Alternativamente, el agente adicional se puede administrar por separado del compuesto de la presente invención, como parte de una forma de dosificación múltiple, en la que dicho agente adicional se administra antes de, junto con o después de una composición que comprende un compuesto de la presente invención.

En aún otra realización la presente invención proporciona el uso de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto de la presente invención para pretratar una sustancia biológica destinada para administración a un paciente. Tales sustancias biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre y componentes de la misma tales como plasma, plaquetas, subpoblaciones de células sanguíneas y similares; órganos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón, etc.; espermia y óvulos; médula ósea y componentes de la misma y otros fluidos para inyectarse en un paciente tales como solución salina, dextrosa, etcétera.

De acuerdo con otra realización la invención proporciona procedimientos in vitro de materiales de tratamiento que pueden potencialmente entrar en contacto con un virus caracterizado por una serina proteasa codificada víricamente necesaria para su ciclo vital. Este procedimiento comprende la etapa de poner en contacto dicho material con un compuesto de acuerdo con la invención. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, instrumentos quirúrgicos y prendas de vestir (por ejemplo, ropas, guantes, delantales, batas, máscaras, gafas, calzado, etc.); instrumentos de laboratorio y prendas (por ejemplo, ropas, guantes, delantales, batas, máscaras, gafas, calzado, etc.); aparatos y materiales de recogida de sangre; y dispositivos invasivos, tales como derivaciones, endoprótesis vasculares, etcétera.

En otra realización, los compuestos de la presente invención se pueden usar como las herramientas de laboratorio para ayudar en el aislamiento de una serina proteasa codificada víricamente. Este procedimiento comprende las etapas de proporcionar un compuesto de la presente invención unido a un soporte sólido; poner en contacto dicho soporte sólido con una muestra que contiene una serina proteasa vírica en condiciones que causan que dicha proteasa vírica se una a dicho soporte sólido; y eluir dicha serina proteasa a partir de dicho soporte sólido. En otra realización, la serina proteasa vírica aislada por este procedimiento es la proteasa del VHC NS3-NS4A.

Con el fin de que la presente invención se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos preparativos y de prueba.

Ejemplos

Se registraron espectros de RMN de ^1H a 500 MHz usando un instrumento Bruker AMX 500. Se analizaron muestras de espec. masiva sobre un espectrómetro de masas MicroMass ZQ o Quattro II operado en modo de EM individual con

ionización por electropulverización. Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas usando la inyección de flujo (FIA) o la cromatografía de flujo. La fase móvil para todos los análisis de espec. de masas consistió en mezclas de acetonitrilo-agua con ácido fórmico al 0,2 % como un modificador.

5 Como se usa en el presente documento, el término "R_t (min)" se refiere al tiempo de retención de HPLC, en minutos, asociado con el compuesto. Los tiempos de retención de HPLC enumerados se obtuvieron a partir de los datos de espec. de masas o usando el siguiente procedimiento: Instrumentos: Hewlett Packard HP-1050;

Columna: YMC C₁₈ (n.º de cat.: 326289C46);

Gradiente/tiempo de gradiente: CH₃CN al 10-90 %/H₂O durante 9 minutos, después CH₃CN al 100 % durante 2 minutos;

10 Caudal: 0,8 ml/min;

Longitud de onda de detección: 215 nM y 245 nM.

La denominación química para compuestos seleccionados en el presente documento se llevó a cabo usando el programa de denominación proporcionado por CambridgeSoft Corporations ChemDraw Ultra®, versión 7.0.1.

Ejemplo 1 (referencia)

15 (Ciclohexil-{1-[2-(1-ciclopropilaminoxalilbutilcarbamoil)-3-isopropil-pirrolidina-1-carbonil]-2,2-dimetil-propilcarbamoil}-metil)-amida del ácido pirazina-2-carboxílico (56)

A una suspensión en agitación de bromuro-dimetilsulfuro de cobre (9,1 g, 44,28 mmol) en 100 ml de éter seco a -20 °C se añadió bromuro de isopropenilo 0,09 M (100 ml). Después de 15 minutos de agitación, la temperatura se disminuyó a -78 °C y enona 4a (4,0 g, 8,86 mmol, preparada de acuerdo con el procedimiento previsto en el documento JACS, 117, página 10775, (1995)) en 50 ml de éter seguido por TMSCl (2,25 ml, 18 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 h y se desactivó con 100 ml de solución de hidróxido de amonio-cloruro de amonio (1:4). Se extrajo con éter y la fase orgánica se lavó eliminando todas las sales de cobre. La fase de éter se secó con sulfato de sodio y se concentró a vacío a un aceite que se sometió a cromatografía ultrarrápida (éter-hexanos (2:3) proporcionando 3,5 g (al 73 %) de la olefina intermedia deseada).

25 RMN de ¹H (CDCl₃) δ 4,8 (d, 2H); 3,8 (m, 2H); 3,7 (d, 1H); 2,8 (m, 2H); 2,2 (d, 1H); 1,7 (s, 3H); 1,5 (s, 9H); 0,8 (s, 9H); 1 (s, 3H); 0,08 (s, 3H) ppm.

La hidrogenación con Pd-c al 10 % en 1 atmósfera de hidrógeno proporcionó 3,5 g (al 100 %) de la prolina 5b deseada.

30 Se hizo burbujear gas de HCl 5 minutos a una solución de 5b (3,5 g, 6,47 mmol) en 50 ml de acetato de etilo a -20 °C. Se agitó a -20 °C durante 30 minutos después se calentó a ta y se agitó durante 1 hora. Ello se concentró en el vacío a 1,71 g (al 100 %) de un aceite que se redujo con 2,5 equivalentes a LAH 1 M en solución de THF sometida a reflujo durante 4 h. Se enfrió y se sometió a una estimulación de Fieser que proporciona 1,35 g (al 85 %) del compuesto deseado **8b**. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 4,0 (dd, 1H); 3,6 (m, 1H); 3,4 (m, 1H); 3,3 (m, 1H); 3,2 (m, 1H); 2,2 (m, 1H); 1,8 (m, 3H); 1,0 (d, 3H); 0,9 (d, 3H) ppm.

35 A una solución de carbonato de potasio (190 mg, 1,38 mmol) en 4 ml de agua a temperatura ambiente con agitación, se añadió **8b** (357 mg, 2,5 mmol) en 5 ml de THF. La solución se enfrió a -2 °C y cloruro de Cbz (0,447 ml, 3,13 mmol) se añadió gota a gota manteniendo la temperatura a 0 a -2 °C. Se agitó durante 15 minutos adicionales, se vertió en agua helada. La fase acuosa se saturó con sal y la fase orgánica se separó. La extracción adicional con acetato de etilo fue necesaria para extraer todo el compuesto. Los productos orgánicos combinados se lavaron con HCl al 5 %, agua y salmuera, se secaron con sulfato de sodio y se concentraron a vacío a 416 mg (al 60 %) de intermedio de hidroximetilpirrolidina benzoilada. 328 mg de este material se oxidaron con reactivo de Jones proporcionando 260 mg (al 75 %) del intermedio de prolina. La prolina anterior (260 mg, 0,889 mmol) se esterificó con isobutileno en diclorometano con una cantidad catalítica de ácido sulfúrico concentrado a ta en un recipiente sellado durante 48 horas proporcionando 289 mg (al 96 %) del éster intermedio. RMN-¹H (CDCl₃) δ 7,5 (m, 5H); 5,1 (m, 2H); 4,1 (dd, 1H); 3,6 (m, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,1 (m, 2H); 1,7 (m, 2H); 1,5 (s, 9H); 1,1 (d, 3H); 1,0 (d, 3H) ppm.

La hidrogenación con Pd/C al 10% en acetato de etilo dio 290 mg (al 100 %) del compuesto deseado **9b**.

50 A una solución de Cbz-terc-butilglicina (271 mg, 1,02 mmol) en 2 ml de DCM a 0° C se añadió EDC (235 mg, 1,23 mmol), HOBt (203 mg, 1,33 mmol) y DIEA (0,534 ml, 3,07 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 15 minutos después de lo que, el éster de amino **9b** se añadió lentamente en 2 ml de DCM. La mezcla de reacción resultante se agitó a ta durante 16 h. Se concentró a un residuo que se redisolvió en EtOAc. Los sucesivos lavados con HCl 0,5 N, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera dieron después de secar (Na₂SO₄) y de concentración en el vacío el producto deseado que se sometió a cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20 % hexanos al 80 %) proporcionando 480 mg (al 100 %) de dipéptido puro. RMN-¹H (CDCl₃) δ 4,2 (d, 2H); 4,0 (t, 1H); 3,5 (m, 1H); 2,0 (m, 3 HO₂); 2,8 (m, 2H); 1,5 (s, 9H); 1,1 (s, 9H); 1,0 (d, 3H); 0,9 (d, 3H) ppm.

El grupo Cbz del dipeptídico se eliminó como se describe anteriormente y el aminoéster resultante se acopló a la Cbz-ciclohexilglicina mostrada en la etapa siguiente.

5 A una solución de Cbz-ciclohexilglicina (289 mg, 1 mmol) en 2 ml de DCM a 0 °C se añadió EDC (228 mg, 1,19 mmol), HOBt (190 mg, 1,29 mmol) y DIEA (0,517 ml, 2,97 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 15 min. después de lo que, el éster de amino anterior se añadió lentamente en 2 ml de DCM. La mezcla de reacción resultante se agitó a ta durante 16 h. Se concentró a un residuo que se redisolvió en EtOAc. Los sucesivos lavados con HCl 0,5 N, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera dieron después de secado (Na₂SO₄) y concentración en el vacío el producto deseado que se sometió a cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20 %/hexanos al 80 %) proporcionando 556 mg (al 90 %) de tripéptido puro. El grupo Cbz del tripéptido se eliminó como se describe anteriormente y el aminoestertripéptido resultante se acopló a 1,4-pirazina de ácido carboxílico mostrada en la etapa siguiente.

15 A una solución de 1,4-pirazina de ácido carboxílico (110 mg, 0,891 mmol) en 2 ml de DCM se añadió PyBrOP (457 mg, 0,98 mmol) y DIEA (0,465 ml, 2,67 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 15 min. después de lo que, el éster de amino anterior se añadió lentamente en 2 ml de DCM. La mezcla de reacción resultante se agitó a ta durante 16 h. Se concentró a un residuo que se redisolvió en EtOAc. Los sucesivos lavados con HCl 0,5 N, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera dieron después de secado (Na₂SO₄) y concentración en el vacío, el producto deseado que se sometió a cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 50 %/hexanos al 50 %) proporcionando 410 mg (al 79 %) de tripéptido provisto de caperuza puro con RMN de H¹ (CDCl₃) consistente.

20 El grupo éster t-butílico del tripéptido provisto de caperuza (410 mg, 0,688 mmol) se escindió con una mezcla 1:1 TFA-DCM a temperatura ambiente durante 45 minutos y se concentró al vacío. El tripéptido de aminoéster resultante se acopló a la hidroxiamida detallada en la etapa siguiente.

25 A una solución en agitación de ácido de tripéptido provisto de caperuza de anteriormente en 6 ml de DMF seco a 0 °C se añadió, PyBOP (376 mg, 0,722 mmol) seguido por NMM (0,226 ml, 2,06 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a ta después de que una solución de hidroxiamida (168 mg, 0,758 mmol) y 0,226 ml de NMM se añadieran lentamente. La reacción de acoplamiento se agitó durante 16 horas, se diluyó con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con: agua (3X), 10 % de ácido cítrico, agua y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2,5 %/acetato de etilo al 97,5 %) proporcionó 362 mg de tetrapéptido de hidroxiamida que se oxidó con reactivo de peryodinato de Dess-Martin (650 mg, 1,53 mmol) y t-butanol (0,65 ml) en 5 ml de DCM a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se desactivó con solución de tiosulfato de sodio 1 M (2 ml) y se agitó hasta que las dos fases se separaron claramente. La fase orgánica se diluyó con 5 ml más de DCM y se lavó (3X) con de solución acuosa de carbonato de potasio al 10 % (5 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró en el vacío. La cromatografía ultrarrápida (MeOH al 2,5 %/acetato de etilo al 97,5 %) proporcionó 270 mg de cetoamidatetrapéptido **56**. CLEM M+H = 706,42, M-H = 704,42. Tiempo de retención (MeCN-H₂O al 10-90 % con TFA al 0,1 % durante 9 minutos) = 7,73-8,81 min. CLEM M+H = 682,2.

35 Ejemplo 2

Éster *terc*-butílico del ácido 3-*terc*-butil-2-(*terc*-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidina-1-carboxílico (**6a**)

40 Se añadió solución de 0,5 M de t-butilbromuro de cinc en THF (3,7 ml, 1,83 mmol) a una solución de enona 4a (280 mg, 0,85 mmol) en THF con BF₃OEt₂ (350 µl, 2,75 mmol) y TMSCl (465 µl) a -30 °C durante un periodo de 5 minutos. La mezcla heterogénea se agitó a -30 °C durante 3,5 h después se inactivó con solución de NH₄Cl saturada. Se extrajo con éter (3X) y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de sodio y se concentraron al vacío. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al 10%-hexanos) proporcionó 210 mg (al 64 %) de **6a**. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 3,9 (s, 1H); 3,8 (dd, 1H); 3,5 (d, 1H); 2,8 (dd, 1H); 2,3 (d, 1H); 1,9 (d, 1H); 1,4 (s, 9H); 0,9 (s, 18H); 0,1 (s, 3H); 0,05 (s, 3H) ppm.

Ejemplo 3

45 Éster *terc*-butílico de ácido 3-bencil-2-(*terc*-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidina-1-carboxílico (**7a**)

50 A una mezcla de n-butillitio (5,5 ml, 0,0086 mol) y THF a -78 °C, se añadió TMEDA y bencilfenil-sulfuro (1,91 g, 0,0095 mol). La solución incolora se volvió amarillo pálido. Después de 15 minutos de agitación a -78 °C, la pirrolidona 4 (2,4 g, 0,0073 mol) en 10 ml de THF se añadió gota a gota. Después de que la adición se completó, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -78 °C. La reacción se inactivó con solución saturada de NH₄Cl y la mezcla se calentó a ta y se vertió en agua. La mezcla de éter se extrajo con éter etílico y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró en el vacío. La cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al 20 %-hexano) proporcionó 1,69 g (al 45 %) del intermedio deseado. La reducción con 16,9 g de Ra-Ni en sometimiento a reflujo de acetona-agua (1:1) durante 12 h proporcionó, después de cromatografía (acetona-cloroformo al 2 %), 1,11 g (al 83 %) del compuesto deseado **7**. RMN de H¹ (CDCl₃) δ 7,3 (m, 5H); 3,8 (m, 2H); 3,7 (d, 1H); 2,7-2,9 (m, 3H); 2,1 (m, 2H); 1,5 (s, 9H); 1,7 (s, 9H); 0,1 (s, 6H) ppm.

55

Ejemplo 4 (referencia)

({1-[3-bencil-2-(1-ciclopropilaminoxalil-butilcarbamoil)-pirrolidina-1-carbonil]- 2,2-dimetil-propilcarbamoil}-ciclohexilmetil)-amida de ácido pirazina-2-carboxílico (**65**)

Preparada como se describe anteriormente en el esquema 1 comenzando con intermedio **7a** dando **65** con datos analíticos consistentes. Tiempo de retención (MeCN al 10-90 %-H₂O con TFA al 0,1 % durante 6 minutos) = 8,0-9,2 min. CLEM M+H = 730,2

Ejemplo 5

Éster terc-butílico del ácido 3-ciclohexil-pirrolidina-2-carboxílico (**12a**).

[72] Se hidrogenó 3-fenil-prolina **10a** con óxido de platino catalítico en etanol/ácido acético/agua (7/2/1) a 344737,95 pascales (50 psi) de hidrógeno durante 18 h dando 3-ciclohexilprolina cuantitativamente. Se preparó compuesto **12a** de acuerdo con bencilación y esterificación a partir de ejemplo 1; etapa 3.

Ejemplo 6

Éster 1-terc-butílico de éster 2-metílico de ácido 3-ciclopropilmetil-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (**A**)

En un matraz de fondo redondo, se enfrió una solución de la alilprolina (358 mg, 1,33 mmol) en DCE seco a 0 °C y se añadió cinc dietílico en hexanos al 15 % (5,5 ml, 6,63 mmol) lentamente por medio de una jeringuilla. A esta solución se añadió cloroyodometano (967 ul, 13,3 mmol) gota a gota. La solución se agitó a 0 °C durante 20 minutos, se dejó calentar a ta y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se desactivó con solución de NH₄Cl saturada y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Se extrajo con diclorometano, se secó con sulfato de sodio y se concentró en el vacío. La cromatografía (acetato de etilo al 20 %-hexanos) dio 65 mg (al 17 %) del producto deseado **A**. RMN de H¹ (CDCl₃) δ 3,8 (s, 1H); 3,7 (s, 3H); 3,6-3,4 (m, 2H); 2,4 (m, 1H); 2,3 (m, 1H); 1,3 (m, 3H); 0,8 (m, 1H); 0,5 (m, 2H); 0,2 (m, 2H) ppm.

Ejemplo 7

Éster metílico de ácido 3-ciclopropilmetil-1-(3-metil-2-{3-metil-2-[(pirazina-2-carbonil)-amino]-butirilamino}-butirilo)-pirrolidina-2-carboxílico (**C**)

Se preparó tripéptido **C** acoplando ciclopropilmetilprolina **A** (41 mg, 0,16 mmol) y dipéptido **B** provisto de caperuza (52 mg, 0,16 mmol) con EDC/HOAt dando 60 mg (al 77 %) del tripéptido **C** deseado después de cromatografía (acetato de etilo-hexanos 1:1). RMN de H¹ (CDCl₃) δ 9,4 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 8,5 (s, 1H); 8,2 (d, 1H); 6,5 (d, 1H); 4,6 (t, 1H); 4,5 (t, 1H); 4,2 (m, 1H); 3,8 (s, 3H); 3,7 (m, 2H); 2,3 (m, 4H); 2,2 (m, 2H); 1,5 (s, 12H); 1,3 (m, 2H); 1,0 (m, 2H); 0,5 (m, 2H) ppm.

Ejemplo 8

Ácido 2-(3-{[3-ciclopropilmetil-1-(3-metil-2-{3-metil-2-[(pirazina-2-carbonil)-amino]-butirilamino]-butiril)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-2-oxo-hexanoilamino)-3-fenil-propionico (**D**)

Preparado como en el ejemplo 1. Tiempo de retención (MeCN al 10-90 %-H₂O con TFA al 0,1 % a lo largo de 6 minutos) = 7,55-7,78 min. CLEM M+H = 748,3.

Ejemplo 9**35 Protocolo de ensayo de células de replicón de VHC:**

Las células que contienen virus de la hepatitis C (VHC) se mantuvieron en DMEM conteniendo suero fetal bovino al 10 % (FBS), 0,25 mg por ml de G418, con suplementos apropiados (medios A).

En el día 1, la monocapa de células de replicón se trató con una mezcla de tripsina:EDTA, se eliminó y después los medios se diluyeron a una concentración final de 100.000 células/ml a saber. Se plaquearon 10.000 células en 100 ul en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se cultivaron durante toda una noche en un incubador de cultivo de tejidos a 37 °C.

En el día 2, los compuestos (en DMSO al 100 %) se diluyeron en serie en DMEM conteniendo FBS al 2 %, DMSO al 0,5 %, con suplementos apropiados (medios B). La concentración final de DMSO se mantuvo al 0,5 % en toda la serie de diluciones.

45 Se eliminaron los medios en la monocapa de células de replicón y después se añadieron medios B conteniendo diversas concentraciones de compuestos. Se añadieron medios B sin compuesto alguno a otros pocillos como controles sin ningún compuesto.

Las células se incubaron con el compuesto o con DMSO al 0,5 % en medios B durante 48 horas en un incubador de cultivo tisular a 37 °C. Al final de las 48 horas de incubación, los medios se eliminaron y la monocapa de células de replicón se lavó una vez con PBS y se almacenó a -80 °C antes de la extracción de ARN.

- 5 Las placas de cultivo con monocapas de células de replicón tratadas se descongelaron y una cantidad fija de otro virus ARN, tal como el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) se añadieron a células en cada pocillo. Se añadieron reactivos de extracción de ARN (tales como reactivos de kit de RNeasy) a las células inmediatamente evitando degradación de ARN. Se extrajo ARN total de acuerdo con la instrucción del fabricante con modificación mejorando la eficiencia y consistencia de extracción. Finalmente, el ARN celular total, incluyendo el ARN de replicón de VHC, se eluyó y se almacenó a -80 °C hasta procesamiento adicional.
- 10 El ensayo de cuantificación de RT-PCR en tiempo real de Taqman se estableció con dos conjuntos de cebadores específicos y sonda. Una era para VHC y la otra era para BVDV. Las extracciones de ARN totales para células de replicón de VHC tratadas se añadieron a las reacciones de PCR para cuantificación ARN de tanto de VHC como de ARN de BVDV en el mismo pocillo de PCR. Se señaló y rechazó fallo experimental en base al nivel de ARN de BVDV en cada pocillo. El nivel de ARN del VHC, en cada pocillo se calculó de acuerdo con un funcionamiento de curva estándar en la misma placa de PCR. El porcentaje de inhibición o disminución del nivel de ARN del VHC debido al tratamiento del compuesto se calculó usando el DMSO o ningún compuesto de control como el 0 % de inhibición. La CI_{50} (concentración a la que el 50% de inhibición de nivel de ARN de VHC se observa) se calculó a partir de la curva de valoración de cualquier compuesto dado.

Ejemplo 10

20 Protocolo de ensayo de K_i de VHC:

Procedimiento de HPLC Microbore para separación de sustrato y productos de 5AB

Sustrato:

NH_2 -Glu-Asp-Val-Val-(alfa)Abu-Cys-Ser-Met-Ser-Tyr-COOH

- 25 Una solución madre de 5AB 20 mM (o concentración de su elección) se hizo en DMSO p/TDT 0,2 M. Esto se almacenó en alícuotas a -20 °C.

Tampón: HEPES 50 mM, pH 7,8; glicerol al 20 %; NaCl 100 mM

El volumen de ensayo total fue 100 μ l

	X1 (μ l)	conc. en ensayo
Tampón	86,5	véase más arriba
KK4A 5 mM	0,5	25 μ M
DTT 1 M	0,5	5 mM
DMSO o inhibidor	2,5	2,5 % v/v
tNS3 50 μ M	0,05	25 nM
5AB 250 μ M (iniciar)	20	25 μ M

- 30 El tampón, KK4A, TDT y tNS3 se combinaron; se distribuyeron en 78 ml cada uno dentro de los pocillos de placa de 96 pocillos. Esto se incubó a 30 °C durante 5-10 min.

2,5 μ l de una concentración apropiada de compuesto de prueba se disolvieron en DMSO (DMSO solo para control) y se añadieron a cada pocillo. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Reacción iniciada por adición de 20 μ l de sustrato de 5AB 250 μ M (la concentración 25 μ M es equivalente o ligeramente más baja que la K_m para 5AB).

- 35 Se incubó durante 20 minutos a 30 °C.

La reacción se terminó por adición de 25 μ l de TFA al 10 %. Se transfirieron alícuotas de 120 μ l a viales de HPLC.

Se separó el producto SMSY del sustrato y KK4A por el siguiente procedimiento:

Procedimiento de separación Microbore:

Instrumentación: Agilent 1100

Desgasificador G1322A

Bomba binaria G1312A

Automuestreador G1313A

5 Cámara termostatzada de columna G1316A

Detector de disposición de diodos G1315A

Columna:

Phenomenex Jupiter; C18 de 5 microómetros; 300 angstroms; 150 x 2 mm; P/O 00F-4053-B0

Termostato de columna: 40 °C

10 Volumen de inyección: 100 µl

Disolvente A = agua de calidad HPLC + TFA al 0,1 %

Disolvente B = acetonitrilo de calidad HPLC + TFA al 0,1 %

Tiempo (min)	% de B	Caudal (ml/min)	Presión máxima
0	5	0,2	400
12	60	0,2	400
13	100	0,2	400
16	100	0,2	400
17	5	0,2	400

Tiempo de detención: 17 minutos.

Tiempo tras funcionamiento: 10 min.

15 La tabla 1 dada más adelante representa datos de Cl_{50} para ciertos compuestos de la invención.

Los compuestos con K_i que varían de $0,5 \mu\text{M}$ a $> 1 \mu\text{M}$ se designan A. Los compuestos con K_i que varían de $0,5 \mu\text{M}$ a $0,1 \mu\text{M}$ se designan B. Los compuestos con K_i por debajo de $0,1 \mu\text{M}$ se designan C. Los compuestos con Cl_{50} que varían de $1 \mu\text{M}$ a $> 10 \mu\text{M}$ se designan A. Los compuestos con Cl_{50} que varían a partir de $1 \mu\text{M}$ hasta $0,5 \mu\text{M}$ se designan B. Los compuestos con Cl_{50} inferiores a $0,5 \mu\text{M}$ se designan C. ND quiere decir no hay datos.

20

Tabla 1:

Compuesto	K_i	Cl_{50}
5	C	ND
15	B	ND
16	B	ND
19	B	ND
20	B	ND
22	B	ND
25	B	ND
26	C	ND
27	C	ND
28	C	ND
29	C	ND

(continuación)

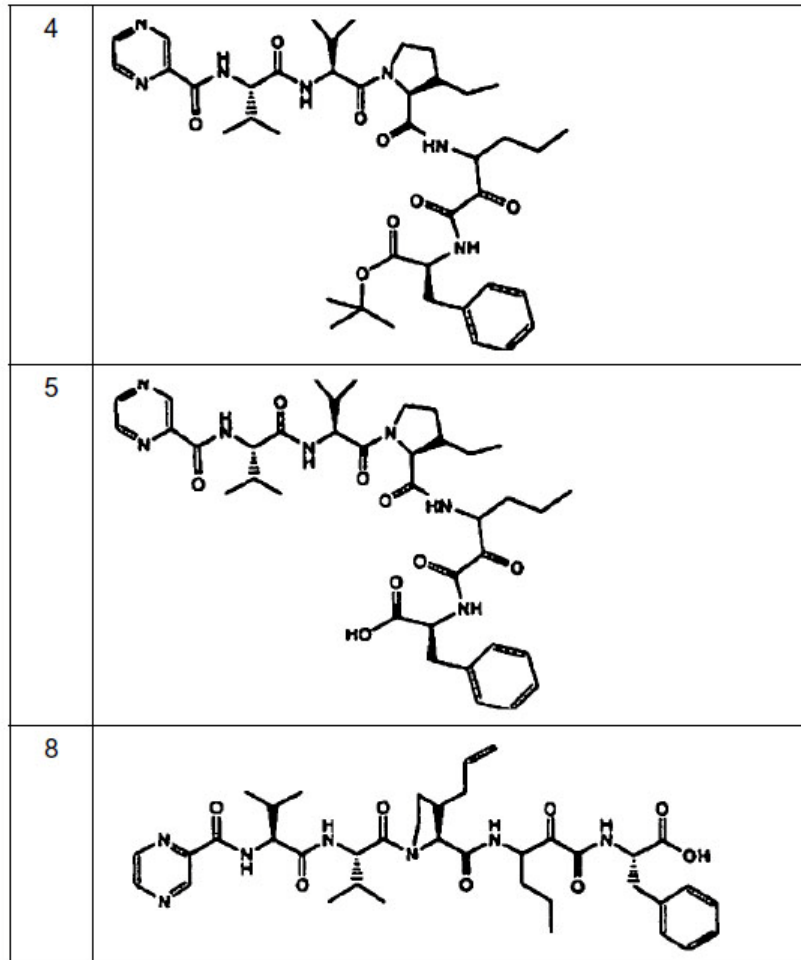
30	B	ND
31	C	ND
32	B	ND
33	B	ND
35	A	ND
36	B	ND
39*	C	B
41	A	C
42	C	ND
43*	B	ND
44*	B	B
45*	A	ND
46*	B	ND
50*	B	ND
51*	B	ND
52*	C	c
53*	B	ND
54*	B	A
55*	C	B
56*	B	ND
57	C	ND
60*	ND	A
62*	C	B
63*	c	B
64*	B	A
65*	c	B
66*	B	B
67*	A	A
68*	C	C
69*	C	C
71*	C	A
72*	C	B
73*	B	A

(continuación)

74*	B	A
75*	B	A
76*	B	A
77*	B	A
*experimentos de comparación		

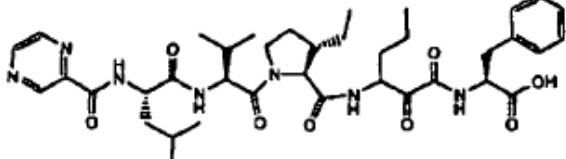
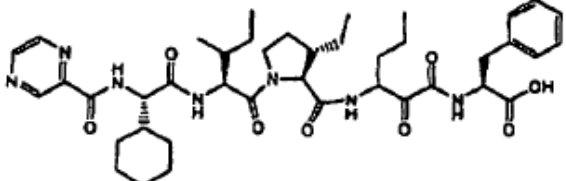
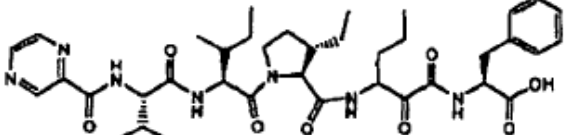
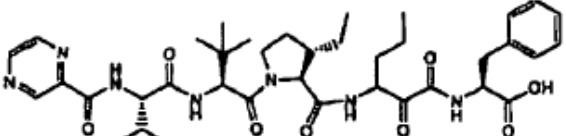
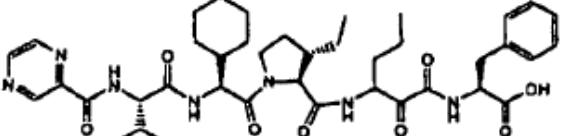
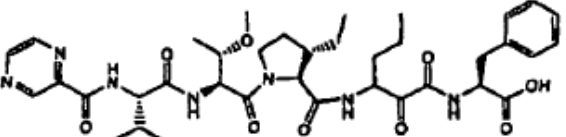
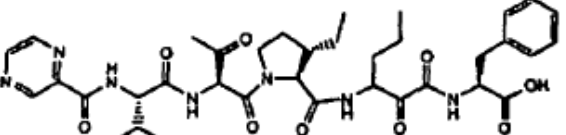
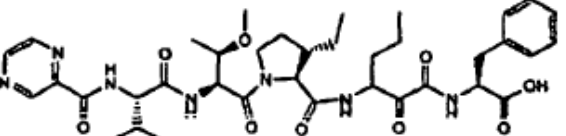
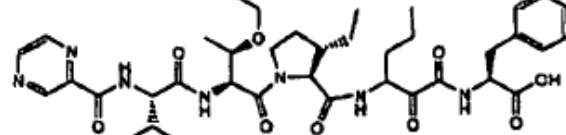
REIVINDICACIONES

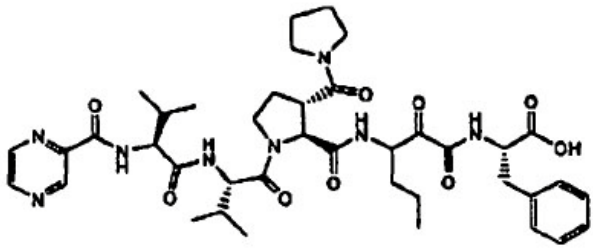
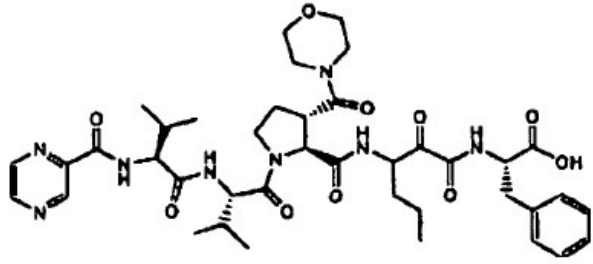
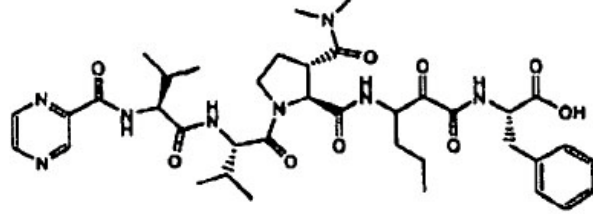
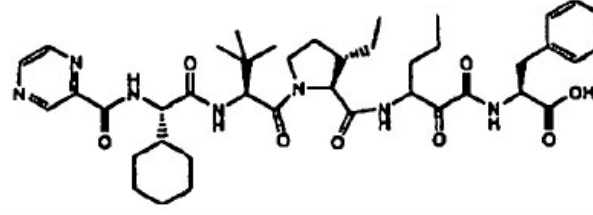
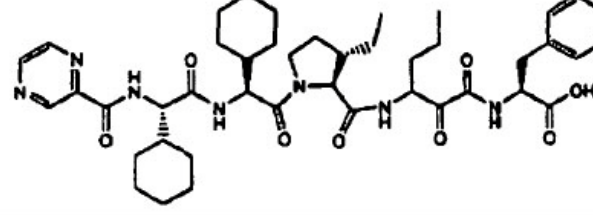
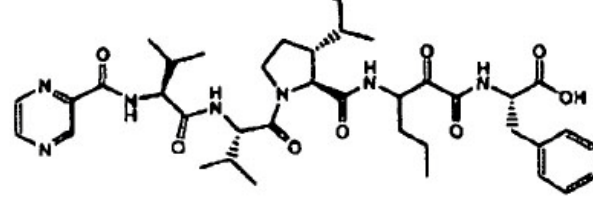
1. Un compuesto seleccionado de:



9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

17	
18	
19	
20	
21	
22	
26	
27	

28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	

37	
38	
40	
41	
42	
57	

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o mezcla de la misma en una cantidad efectiva para inhibir una serina proteasa; y un transportador, coadyuvante o vehículo aceptable.

5 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha composición está formulada para administración a un paciente.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha composición comprende un agente adicional seleccionado de un agente inmunomodulador; un agente antiviral; un segundo inhibidor de proteasa de VHC; un

inhibidor de otro objetivo en el ciclo vital de VHC; y un inhibidor del citocromo p-450; o combinaciones de los mismos.

- 5 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho agente inmunomodulador es α -, β -, o γ -interferón o timosina; dicho agente antiviral es ribavirina, amantadina, o telbivudina; o dicho inhibidor de otro objetivo en el ciclo vital de VHC es un inhibidor de VHC helicasa, polimerasa, o metaloproteasa.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho inhibidor del citocromo P-450 es ritonavir.
7. Un procedimiento *in vitro* de inhibir la actividad de una serina proteasa en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha serina proteasa con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha serina proteasa es una proteasa NS3 de VHC.
9. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 3 en la elaboración de un medicamento para tratar una infección por VHC en un paciente.
- 15 10. Un procedimiento *in vitro* de eliminar o reducir la contaminación de VHC de una muestra biológica o de equipamiento médico o de laboratorio, que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica o dicho equipamiento médico o de laboratorio con una composición de acuerdo con la reivindicación 2.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha muestra o equipamiento se selecciona de sangre, otros fluidos corporales, tejido biológico, un instrumento quirúrgico, una prenda quirúrgica, un instrumento de laboratorio, una prenda de laboratorio, un aparato de recogida de sangre o de otro fluido corporal; un material de almacenamiento de sangre o de otro fluido corporal.
- 20 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho fluido corporal es sangre.