

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 731**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009 E 09792995 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2337784**

54 Título: **Compuestos macrocíclicos como inhibidores del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

29.09.2008 US 100901 P

24.09.2009 US 566441

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

24.04.2013

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 05843-4000 , US

72 Inventor/es:

HIEBERT, SHELDON;
RAJAMANI, RAMKUMAR;
SCOLA, PAUL MICHAEL;
BOWSHER, MICHAEL S. y
LI, RONGTI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 401 731 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

Compuestos macrocíclicos como inhibidores del virus de la hepatitis C

5 La presente divulgación se refiere de forma general a compuestos antivirales, y más específicamente, se refiere a compuestos que inhiben la función de la proteasa NS3 (también denominada en el presente documento “serina proteasa”) codificada por el virus de la hepatitis C (VHC), a composiciones que comprenden dichos compuestos y a procedimientos para inhibir la función de la proteasa NS3.

10 El VHC es un importante patógeno humano que infecta a unos 170 millones de personas en todo el mundo (aproximadamente cinco veces el número de infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1). Una fracción sustancial de estos individuos infectados por el VHC desarrolla una enfermedad hepática progresiva grave, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular.

15 En la actualidad, la terapia más eficaz contra el VHC emplea una combinación de alfa-interferón y ribavirina, que conduce a una eficacia sostenida en el 40 % de los pacientes. Recientes resultados clínicos demuestran que el interferón alfa pegilado es superior al interferón alfa sin modificar como monoterapia. No obstante, incluso con regímenes terapéuticos experimentales que implican combinaciones de alfa-interferón pegilado y ribavirina, una sustancial fracción de pacientes no tienen una reducción sostenida de la carga vírica. Por lo tanto, existe una clara y no satisfecha necesidad de desarrollar terapias eficaces para el tratamiento de la infección por VHC.

20 El VHC es un virus de ARN de polaridad positiva. Basándose en una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida y la gran similitud en la región 5' no traducida, el VHC ha sido clasificado como un género diferente de la familia Flaviviridae. Todos los miembros de la familia Flaviviridae presentan viriones encapsulados que contienen un genoma de ARN de polaridad positiva que codifica todas las proteínas específicas del virus conocidas mediante traducción de un marco de lectura abierto, ininterrumpido y único.

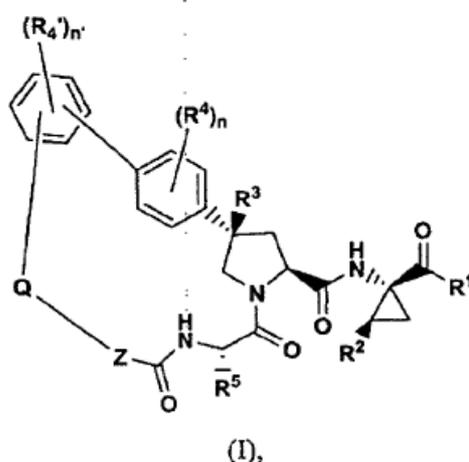
25 A lo largo del genoma del VHC hay una heterogeneidad considerable dentro de la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos codificada. Se han caracterizado seis genotipos principales y se han descrito más de 50 subtipos. Los principales genotipos del VHC difieren en su distribución por todo el mundo y la significación clínica de la heterogeneidad genética del VHC sigue siendo elusiva a pesar de los numerosos estudios sobre el posible efecto de los genotipos sobre la patogenicidad y la terapia.

30 El genoma de ARN monocatenario de VHC tiene una longitud de aproximadamente 9500 nucleótidos y tiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una única poliproteína grande de aproximadamente 3000 aminoácidos. En las células infectadas, esta poliproteína es escindida en múltiples sitios por proteasas celulares y víricas para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). En el caso del VHC, la generación de proteínas no estructurales maduras (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) es llevada a cabo por dos proteasas víricas. La primera escinde la unión entre NS2 y NS3; la segunda es una serina proteasa contenida en la región del extremo N de NS3 y actúa de mediadora de todas las posteriores escisiones de cadena abajo de NS3, tanto en cis, en el sitio de escisión de NS3 y NS4A, como en trans, para el resto de los sitios NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. La proteína NS4A parece desempeñar varias funciones, ya sea actuando de cofactor para la proteasa NS3 como ayudando en la localización en la membrana de NS3 y otros componentes de las replicasas víricas. La formación del complejo de la proteína NS3 con NS4A es esencial para el procesamiento eficiente de poliproteínas, lo que potencia la eficacia proteolítica en todos los sitios. La proteína NS3 también muestra actividades de nucleósido trifosfatasa y ARN helicasa. La NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que está implicada en la replicación de VHC.

40 Los documentos WO 2008/051514, WO 2007/015787 y US 2007/0027071 se refieren a compuestos macrocíclicos que son útiles como inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. Por tanto, son adecuados para tratar o prevenir infecciones por el VHC.

45 La presente divulgación proporciona compuestos peptídicos que pueden inhibir el funcionamiento de la proteasa NS3, por ejemplo en combinación con la proteasa NS4A. Además, la presente divulgación describe la administración de un tratamiento de combinación a un paciente, mediante el cual un compuesto de acuerdo con la presente divulgación, que es efectivo para inhibir la proteasa NS3 del VHC, se puede administrar con otros compuestos que tienen actividad anti VHC.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que

n y n' son, cada uno de forma independiente, 0, 1, 2 o 3;

R¹ se selecciona de hidroxilo y -NHSO₂R⁶;

R² se selecciona de hidrógeno, alqueno, alquilo y cicloalquilo, en el que el alqueno, el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o cuatro grupos halo;

R³ se selecciona de hidrógeno, alcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfonilo, alquilsulfoxilo e hidroxilo;

y R⁴ y R^{4'} se seleccionan de forma independiente de alcoxi, alquilo, ciano, halo, haloalcoxi, haloalquilo, hidroxilo y -NR^aR^b;

R⁵ se selecciona de hidrógeno, alqueno, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo;

en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de alcoxi, haloalcoxi, halo, haloalquilo, ciano y dialquilamino;

R⁶ se selecciona de alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo (cicloalquil)alquilo, heterociclilo -NR^aR^b;

en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, ciano, cianoalquilo y haloalcoxi;

R⁸ y R^b se seleccionan de forma independiente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo;

Q es una cadena de C₄₋₈ saturada o insaturada, en la que la cadena está opcionalmente sustituida con uno, dos, tres o cuatro grupos seleccionados de forma independiente de alquilo, halo y haloalquilo, en la que los grupos alquilo y haloalquilo pueden formar opcionalmente un anillo de 3-7 miembros con el átomo de carbono al que están unidos; y Z se selecciona de O, CH₂ y NR², en el que R² se selecciona de hidrógeno y alquilo.

En una primera realización del primer aspecto, la presente revelación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sales farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ es -NHSO₂R⁶. En una segunda realización del primer aspecto, n y n' son cada uno 0 o 1. En una tercera realización del primer aspecto, Q es una cadena de C₄₋₇ insustituida saturada y Z es O. En una cuarta realización del primer aspecto, R³ es alcoxi. En una quinta realización del primer aspecto, R² se selecciona del alqueno, alquilo sustituido con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido. En una sexta realización del primer aspecto, R⁵ es alquilo.

En una séptima realización del primer aspecto, la presente revelación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sales farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ es -NHSO₂R⁶; R² se selecciona del alqueno, alquilo sustituido con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido; y R⁵ es alquilo.

En una octava realización del primer aspecto, la presente revelación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n y n' son, cada uno, 0 o 1; R¹ es -NHSO₂R⁶; en el que R⁶ es cicloalquilo; R² se selecciona del alqueno, alquilo sustituido con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido; R³ es alcoxi; R⁵ es alquilo; Q es una cadena de C₄₋₇ saturada insustituida; y Z es O.

En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una primera realización del segundo aspecto, la composición comprende además al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra el VHC. En una segunda realización del segundo aspecto, al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina. En una tercera realización del segundo aspecto, el interferón se selecciona de entre interferón alfa-2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa-2A e interferón tau linfoblastoide.

En una cuarta realización del segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al menos un compuesto adicional que presenta actividad contra VHC, en la que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona a partir de interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T cooperadores de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

En una quinta realización del segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra el VHC, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada de metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, uno, dos, tres, cuatro o cinco compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una primera realización del tercer aspecto, la composición comprende tres o cuatro compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC. En una segunda realización del tercer aspecto, la composición comprende uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una primera realización del cuarto aspecto, el procedimiento comprende además administrar al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra el VHC antes, después o simultáneamente al compuesto de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una segunda realización del cuarto aspecto, al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina. En una tercera realización del cuarto aspecto, el interferón se selecciona de interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.

En una cuarta realización del cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la invención para usar en un procedimiento para tratar una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra VHC antes, después o simultáneamente al compuesto de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona de interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

En una quinta realización del cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la invención para usar en un procedimiento para tratar una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra VHC antes, después o simultáneamente al compuesto de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana que se selecciona a partir de metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno, dos, tres, cuatro o cinco compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC antes, después o de forma simultánea con el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una primera realización del quinto aspecto, el procedimiento comprende administrar tres o cuatro compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC. En una segunda realización del quinto aspecto, el procedimiento comprende administrar uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC.

Otros aspectos de la presente realización pueden incluir combinaciones adecuadas de realizaciones reveladas en el presente documento.

Se pueden encontrar aún otros aspectos y realizaciones en la descripción proporcionada en el presente documento.

5 La descripción de la presente realización en el presente documento se interpretaría de forma congruente con las leyes y principios de la formación de enlaces químicos. En algunos casos, puede ser necesario eliminar un átomo de hidrógeno para acomodar un sustituyente en cualquier lugar dado.

Se entenderá que los compuestos comprendidos por la presente divulgación son aquellos que son adecuadamente estables para usar como un agente farmacéutico.

10 Se desea que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en otro lugar en esa molécula. Por ejemplo, cuando n es 2, cada uno de los dos grupos R^4 pueden ser iguales o diferentes.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y referencias bibliográficas citadas en la memoria descriptiva se incorporan en el presente documento mediante referencia en su totalidad. En el caso de inconsistencias, la presente divulgación, incluyendo definiciones, prevalecerá.

15 Como se usa en el presente documento, las formas del singular “un” “uno/una” y “el/la” incluyen referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “alqueno”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a seis átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace.

20 El término “alcoxi,” tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo unido al resto molecular principal a través de un átomo de oxígeno.

El término “alquilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo derivado de un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.

25 El término “alquilsulfanilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido a un resto molecular principal mediante un átomo de azufre. Hidrocarburo saturado de cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.

El término “alquilsulfanilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido a un resto molecular principal mediante un grupo sulfonilo. Hidrocarburo saturado de cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.

30 El término “alquilsulfonilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido a un resto molecular principal mediante un grupo sulfoxilo.

35 El término “arilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo fenilo o un sistema de anillo bicíclico condensado en el que uno o ambos de los anillos es un grupo fenilo. Los sistemas de anillo bicíclico condensado están constituidos por un grupo fenilo condensado con un anillo carbocíclico aromático o no aromático de cuatro a seis miembros. Los grupos arilo de la presente invención pueden estar unidos al resto molecular principal a través de cualquier átomo de carbono sustituible en el grupo. Ejemplos representativos de grupos arilo incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, indanilo, indenilo, naftilo, fenilo y tetrahidronaftilo.

El término “arilalquilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos arilo.

El término “ciano”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a -CN.

40 El término “cianoalquilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos ciano.

El término “cicloalquilo,” tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un sistema de anillo hidrocarbonado saturado monocíclico o bicíclico que tiene de tres a siete átomos y ningún heteroátomo. Ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, y ciclopentilo.

45 El término “(cicloalquil)alquilo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos, o tres grupos cicloalquilo.

El término “dialquilamino,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a -NR_pR_q, en el que R_p y R_q son grupos alquilo. Los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes.

Los términos “halo” y “halógeno”, como se usan en el presente documento, se refieren a F, Cl, Br y I.

El término “haloalcoxi”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo haloalquilo unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.

El término “haloalquilo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno.

- 5 El término “heterociclilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo de cinco, seis o siete miembros que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de cinco miembros tiene de ninguno a dos dobles enlaces y los anillos de seis y siete miembros tienen de ninguno a tres dobles enlaces. El término “heterociclilo” también incluye grupos bicíclicos en los que el anillo heterociclilo se condensa con un grupo fenilo, un grupo cicloalqueno monocíclico, un grupo cicloalquilo monocíclico u otro grupo heterociclilo monocíclico; y grupos tricíclicos en los que un sistema bicíclico está condensado con un grupo fenilo, un grupo cicloalqueno monocíclico, un grupo cicloalquilo monocíclico u otro grupo heterociclilo monocíclico. Los grupos heterociclilo de la presente invención pueden estar unidos al resto molecular principal a través de cualquier átomo de carbono o átomo de nitrógeno en el grupo. Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero no están limitados a, benzotienilo, furilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, isotiazolilo, mofolinilo, ozazolilo, piperazinilo, piperidinilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirrolpiridinilo, pirrolilo, tiazolilo, tienilo y tiomorfolinilo.

El término “heterociclilalquilo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos heterociclilo.

El término “hidroxi”, como se usa en el presente documento, se refiere a -OH.

- 20 El término “-NR^aR^b,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos grupos, R^a y R^b, que están unidos al resto molecular principal a través de un átomo de nitrógeno. R^a y R^b se seleccionan de forma independiente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo;

- 25 Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. El término “sal farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, representa sales o formas híbridas de los compuestos de la presente divulgación que son solubles en agua o solubles en aceite o dispersables, que son, dentro del alcance del juicio médico bien fundamentado, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación es proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable, y son efectivos para su uso deseado. Las sales se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o por separado haciendo reaccionar una funcionalidad básica adecuado con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato; digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesitileno sulfonato, metanosulfonato, naftileno sulfonato, nicotinato, 2-naftaleno sulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-toluenosulfonato y undecanoato. Ejemplos de ácidos que se pueden usar para formar sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, maleico, succínico y cítrico.

- 40 Las sales de adición básica se pueden preparar durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos haciendo reaccionar un grupo ácido con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato, o bicarbonato de un catión metálico o con amoniaco o una amina primaria, secundaria, o terciaria. Los cationes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina y N,N'-dibenciletildiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básicas incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión “actividad anti-VHC” significa que el compuesto es eficaz para tratar el virus VHC.

La expresión “compuestos de la divulgación” y expresiones equivalentes, pretenden incluir compuestos de Fórmula (I), y sus enantiómeros, diastereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables. De forma similar, las referencias a los intermedios se pretende que engloben sus sales cuando el contexto lo permita.

El término “paciente” incluye seres humanos y otros animales.

- 55 La expresión “composición farmacéutica” significa una composición que comprende un compuesto de la divulgación combinado con al menos un vehículo farmacéutico adicional, es decir adyuvante, excipiente o vehículo, tales como diluyentes, agentes conservantes, cargas, agentes de regulación del flujo, agentes disgregantes, agentes

humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes de dispersión, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas de dosificación. Por ejemplo, se pueden usar los ingredientes en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1999).

- 5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria descriptiva para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una razonable proporción de beneficios/riesgos.

El término "sulfonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a $-SO_2-$.

- 10 El término "sulfoxilo", como se usa en el presente documento, se refiere a $-S(O)-$.

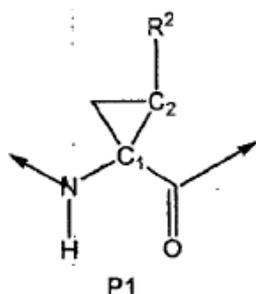
La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz significa la cantidad total de cada componente activo que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, por ejemplo, una reducción mantenida de la carga vírica. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplican a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes

15 activos que dan como resultado el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o simultáneamente.

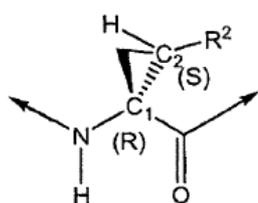
- Los términos "tratar" y "que trata" se refiere a: (i) prevenir la aparición de una enfermedad, trastorno o estado patológico en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o estado patológico pero al que todavía no se le ha diagnosticado que lo tiene; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o estado patológico, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o estado patológico, es decir, causar la regresión de la
- 20 enfermedad, trastorno y/o estado patológico.

- Quando se usa para denominar compuestos de la presente divulgación, las designaciones P1', P1, P2, P2*, P3 y P4, como se usan en el presente documento, indican las posiciones relativas de los residuos aminoácidos de la unión de un inhibidor de la proteasa con respecto a la unión del sustrato de escisión del péptido natural. La escisión se produce en el sustrato natural entre P1 y P1', donde las posiciones que no son prima designan los aminoácidos que comienzan desde el extremo C-terminal del sitio de escisión natural del péptido que se extiende hacia en extremo N; mientras que las posiciones prima emanan desde el extremo N-terminal de la designación del sitio de escisión y se extienden hacia el extremo C. Por ejemplo, P1' se refiere a la primera posición alejada del extremo derecho del extremo C del sitio de escisión (es decir, la primera posición en el extremo N); mientras que P1 comienza la numeración desde el lado izquierdo del sitio de escisión del extremo C, P2: segunda posición desde el extremo C etc.). (véase Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series (1970), B257, 249-264).
- 25
- 30

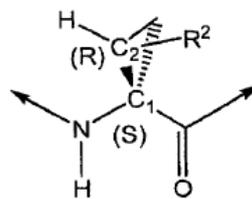
Existen centros asimétricos en los compuestos de la presente divulgación. Por ejemplo, los compuestos pueden incluir el elemento P1 ciclopropilo de fórmula



- 35 en la que cada uno de C_1 y C_2 representan un átomo de carbono asimétrico en las posiciones 1 y 2 del anillo ciclopropilo.

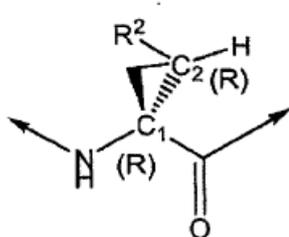


(1R, 2S)
R² está en sin respecto al carbonilo

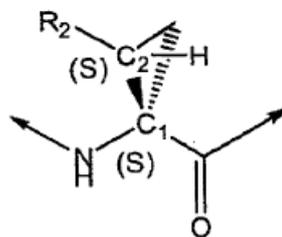


(1S, 2R)
R² está en sin respecto al carbonilo

5



(1R, 2S)
R² está en sin respecto a la amida



(1S, 2R)
R² está en sin respecto a la amida

10

Debe entenderse que la divulgación engloba todas las formas estereoquímicas, o sus mezclas, que poseen la capacidad de inhibir la proteasa del VHC.

15

Ciertos compuestos de la presente discusión pueden existir también en formas conformacionales estables diferentes que pueden ser separables. La asimetría torsional debida a rotación restringida sobre un enlace individual asimétrico, por ejemplo debido a su impedimento estérico o tensión de anillo, puede permitir la separación de conformadores diferentes. La presente divulgación incluye cada isómero conformacional de estos compuestos y mezclas de los mismos.

Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en forma zwitteriónica y la presente divulgación incluye cada forma zwitteriónica de estos compuestos y mezclas de los mismos.

20

Aunque es posible que, para su uso en tratamiento, se puedan administrar cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto de fórmula (I), así como sales, o un solvato, del mismo, como producto químico básico, es posible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de Fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, son tal como se han descrito con anterioridad. El/Los vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial(es) para el receptor del/de los mismo(s). De acuerdo con otro aspecto de la divulgación se proporciona también un procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar un compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25

30

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitaria que contiene una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. En una monoterapia para la prevención y tratamiento de enfermedad mediada por VHC son típicos niveles de dosis que varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150 miligramos por kilogramo ("mg/kg") de peso corporal por día, con preferencia de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos de la divulgación. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se administrarán desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o de forma alternativa, en forma de infusión continua. Dicha administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo de la afección que se esté tratando, de la gravedad de la afección, del tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción del compuesto usado, la duración del tratamiento y la edad, sexo, peso y afección del paciente. Las

35

composiciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria, como se describe anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas, de un principio activo. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas sustancialmente por debajo de la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. En general, el compuesto se administra, de la forma más deseable a un nivel de concentración que generalmente conseguirá resultados antiviralmente eficaces sin provocar efectos secundarios dañinos ni perjudiciales.

Cuando las composiciones de esta divulgación comprenden una combinación de un compuesto de la presente divulgación y uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional pueden estar presentes en una dosis que es inferior o igual a la dosis que normalmente se administra en una pauta de monoterapia. Las composiciones de la presente divulgación se pueden formular de forma conjunta con uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales, por ejemplo en forma de un comprimido monolítico y/o bi/multicapas o se pueden administrar por separado del o los agentes terapéuticos y/o profilácticos.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden adaptar para su administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa o inyecciones intradérmicas o infusiones). Tales formulaciones se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, asociando el principio activo con el/los vehículo(s) o excipiente(s).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades pequeñas tales como cápsulas o comprimidos; polvo o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o batidos; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo inerte, oral, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan moliendo el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclando con un vehículo farmacéutico molido de forma similar tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente saborizante, conservante, dispersante y colorante.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla de polvo, como se ha descrito anteriormente, y llenando envolturas de gelatina formadas. Se pueden añadir agentes deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, o polietilenglicol sólido a la mezcla en polvo antes de la operación de carga. Un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio, o carbonato de sodio puede también añadirse para incrementar la disponibilidad del medicamento cuando la cápsula es ingerida.

Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar agentes aglutinantes, lubricantes, disgregantes y colorantes adecuados a la mezcla. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz y gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formularon, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulando o soldando con fusión incompleta, añadiendo un lubricante y disgregante, y prensando en comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, adecuadamente molido, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y, opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinilpirrolidona, un retardante de solución tal como parafina, un acelerador de la resorción, tal como una sal cuaternaria, y/o un agente de absorción, tal como bentonita, caolín o fosfato de dicalcio. La mezcla de polvo se puede granular humedeciendo con un aglutinante, tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia, o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos, y forzando un tamizado. Como alternativa al granulado, la mezcla de polvo se puede pasar a través de una máquina formadora de comprimidos y el resultado son lingotes formados de manera imperfecta rotos en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para prevenir que se peguen a los moldes formadores de comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación, la mezcla lubricada se comprime en comprimidos. Los compuestos de la presente revelación también se pueden combinar con un vehículo inerte de flujo libre y comprimir en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o precompresión. Se puede proporcionar un recubrimiento protector claro u opaco que consiste en una capa de sellado de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento abrillantador de cera. Se pueden añadir pigmentos a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Los fluidos orales tales como solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria tal que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa con sabor adecuado, mientras que los elixires se preparan con el uso de un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes de isoestearilo etoxilados y éteres de polioxietilen sorbitol, conservantes, aditivo aromático, tal como aceite de menta o edulcorantes

naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando sea apropiado, las formulaciones unitarias de dosificación para la administración oral se pueden microencapsular. La formulación se puede preparar también para prolongar o mantener la liberación como por ejemplo revistiendo o incrustando material particulado en polímeros, ceras, o similares.

- 5 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Se pueden formar liposomas a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

- 10 Los compuestos de la fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables también se pueden administrar usando anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos también se pueden acoplar a polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidafenol, polihidroxietilaspirtamidafenol, o polietilénóxidopolilisina sustituida con residuos de palitoílo. Además, los compuestos se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poli-epsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de hidrogeles de bloque reticulados o anfipáticos.

- 15 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo puede administrarse a partir de un parche mediante iontoforesis, como se describe en general en la publicación *Pharmaceutical Research*, 3(6):318 (1986).

20 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

- 25 Para tratamientos del ojo o de otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las formulaciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo se puede usar bien con una base parafínica o bien con una base de pomada mezclable en agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de aceite-en-agua o con una base de agua-en-aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas para el ojo incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

- 30 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen tabletas, pastillas y enjuagues bucales.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden presentar como supositorios o como enemas.

- 35 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que se administra en la forma en la que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la vía nasal a partir de un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para la administración como un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones de aceite o acuosas del principio activo.

- 40 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas, que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados dosificadores.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

- 45 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor objetivo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en estado de secado por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

- 50

Se debe entender que, además de los ingredientes mencionados en particular anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, las adecuadas para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

- 5 La Tabla 1 dada a continuación enumera algunos ejemplos ilustrativos de compuestos que se pueden administrar con los compuestos de esta divulgación. Los compuestos de la divulgación se pueden administrar con otros compuestos con actividad contra el VHC en terapia de combinación, bien de forma conjunta o por separado o combinando los compuestos para formar una composición.

Tabla 1

<i>Nombre comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Compañía suministradora</i>
NIM811 Debio-025		Inhibidores de ciclofilina	Novartis Debiopharm
Zadaxin		Inmunomodulador	Sciclone
Suvus		Azul de metileno	Bioenvision
Actilón (CPG10101)		Agonista de TLR9	Coley
Batabulin (T67)	Anticanceroso	Inhibidor de β - tubulina	Tularik Inc., South San Francisco, CA
ISIS 14803	Antiviral	Antisentido	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA / Elan Pharmaceuticals Inc., New York, NY
Summetrel	Antiviral	Antiviral	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
GS-9132 (ACH-806)	Antiviral	Inhibidor del VHC	Achillion / Gilead
Compuestos de pirazolopirimidina y sales, del documento WO-2005047288 de 26 de mayo de 2005	Antiviral	Inhibidores del VHC	Arrow Therapeutics Ltd.
Levovirina	Antiviral	Inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Merimepodib (VX-497)	Antiviral	Inhibidor de IMPDH	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
XTL-6865 (XTL-002)	Antiviral	Anticuerpo monoclonal	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Israel
Telaprevir (VX-950, LY-5703 10)	Antiviral	Inhibidor de la serina proteasa NS3	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA / Eli Lilly and Co. Inc., Indianapolis, IN
HCV-796	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Wyeth / Viropharma
NM -283	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Idenix / Novartis
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
GL-60667	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
2'C MeA	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gilead
PSI6130	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
R1626	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche

ES 2 401 731 T3

(continuación)

Nombre comercial	Clase fisiológica	Tipo de inhibidor o diana	Compañía suministradora
2'C Metil adenosina	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Merck
JTK-003	Antiviral	Inhibidor de RdRp	Japan Tobacco Inc., Tokio, Japón
Levovirina	Antiviral	Ribavirina	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
Ribavirina	Antiviral	Ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Viramidina	Antiviral	Profármaco de ribavirina	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	Antiviral	Ribozima	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
BILN-2061	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Alemania
SCH 503034	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Schering Plough
Zadazim	Inmunomodulador	Inmunomodulador	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Mateo, CA
Ceplene	Inmunomodulador	Inmunomodulador	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
CellCept	Inmunosupresor	Inmunosupresor de IgG de VHC	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Civacir	Inmunosupresor	Inmunosupresor de IgG de VHC	Nabi Biopharmaceuticals Inc., Boca Ratón, FL
Albuferón - α	Interferón	Albúmina IFN- α 2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Infergen A	Interferón	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
Omega IFN	Interferón	IFN- ω	Intarcia Therapeutics
IFN- β y EMZ701	Interferón	IFN- β y EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canadá
Rebif	Interferón	IFN- β 1a	Serono, Ginebra, Suiza
Roferon A	Interferón	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Intrón A	Interferón	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Intrón A y Zadaxin	Interferón	IFN- α 2b/ α 1-timosina	RegeneRx Biopharma. Inc., Bethesda, MD/ SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA
Rebetron	Interferón	IFN- α 2b/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ

ES 2 401 731 T3

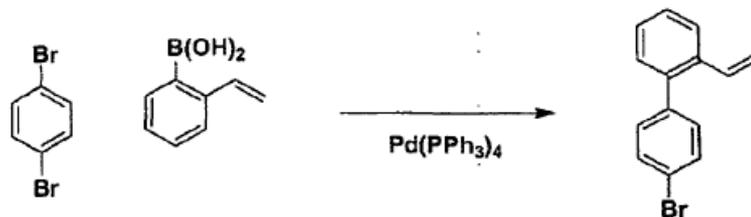
(continuación)

Nombre comercial	Clase fisiológica	Tipo de inhibidor o diana	Compañía suministradora
Actimmune	Interferón	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
Interferón- β	Interferón	Interferón- β -1a	Serono
Multiferón	Interferón	IFN de acción prolongada	Viragen / Valentis
Wellferon	Interferón	IFN- α 1 linfoblastoide	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, Reino Unido
Omniferón	Interferón	IFN- α natural	Viragen Inc., Plantation, FL
Pegasys	Interferón	IFN- α 2a PEGilado	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Pegasys y Ceplene	Interferón	IFN- α 2a PEGilado / modulador inmunológico	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Pegasys y Ribavirina	Interferón	IFN- α 2a PEGilado/ribavirina	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
PEG-Intrón	Interferón	IFN- α 2b PEGilado	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intrón / ribavirina	Interferón	IFN- α 2b PEGilado/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
IP-501	Protección hepática	Antifibrótico	Indevis Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
IDN-6556	Protección hepática	Inhibidor de caspasa	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
ITMN-191 (R-7227)	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Genelabs
ANA-971	Antiviral	Agonista de TLR-7	Anadys
Boceprevir	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Schering Plough
TMS-435	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Tibotec BVBA, Mechelen, Bélgica
BI-201335	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Alemania
MK-7009	Antiviral	Inhibidor de serina proteasas	Merck
PF-00868554	Antiviral	Inhibidor de replicasas	Pfizer
ANA598	Antiviral	Inhibidor no nucleosídico de polimerasa NS5B	Anadys Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA
IDX375	Antiviral	Inhibidor no nucleosídico de replicasa	Idenix Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA
BILB 1941	Antiviral	Inhibidor de polimerasa NS5B	Boehringer Ingelheim Canada Ltd R&D, Laval, QC, Canadá

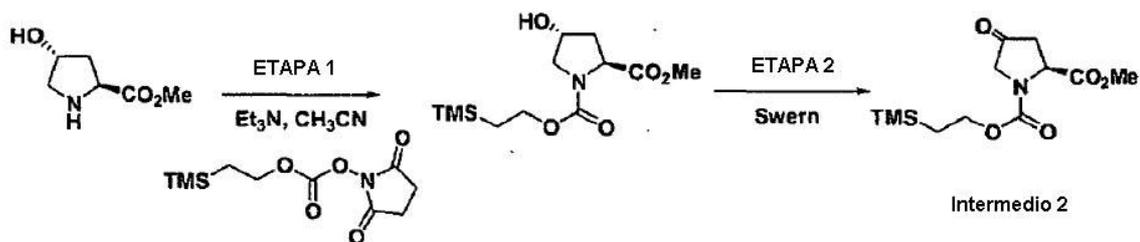
(continuación)

Nombre comercial	Clase fisiológica	Tipo de inhibidor o diana	Compañía suministradora
PSI-7851	Antiviral	Inhibidor nucleosídico de polimerasa	Pharmasset, Princeton, NJ, USA
VCH-759	Antiviral	Inhibidor de polimerasa NS5B	ViroChem Pharma
VCH-916	Antiviral	Inhibidor de polimerasa NS5B	ViroChem Pharma
GS-9190	Antiviral	Inhibidor de polimerasa NS5B	Gilead
Peg-interferón lambda	Antiviral	Interferón	ZymoGenetics / Bristol-Myers Squibb

- 5 Los compuestos de la presente divulgación también se pueden usar como agentes de laboratorio. Los compuestos pueden ser una contribución decisiva para proporcionar herramientas de investigación para diseñar ensayos de replicación del virus, validación de sistemas de ensayo en animales y estudios de biología estructural para potenciar más el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad por VHC. Además, los compuestos de la presente divulgación son útiles para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos antivirales, por ejemplo, por inhibición competitiva.
- 10 Los compuestos de la presente divulgación también pueden ser útiles para tratar o prevenir contaminación viral de materiales y por tanto reducir el riesgo de infección viral de laboratorio o personal médico o pacientes que entren en contacto con tales materiales, por ejemplo, sangre, tejidos, instrumental y prendas quirúrgicas, instrumental y prendas de laboratorio, y aparatos y materiales para la extracción o transfusión de sangre.
- 15 La presente divulgación pretende incluir compuestos que tienen la fórmula (I) cuando se preparan por procedimientos de síntesis o por procedimientos metabólicos, que incluyen los que se producen en el cuerpo humano o animal (*in vivo*) o procedimientos que se producen *in vitro*.
- 20 La presente divulgación se describirá ahora en relación con determinadas realizaciones que no se pretende que limiten su alcance. Por el contrario, la presente divulgación abarca todas las alternativas, modificaciones y equivalentes y puede incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones. Así, los siguientes ejemplos, que incluyen realizaciones específicas, ilustrarán una práctica de la presente divulgación, entendiéndose que los ejemplos son para fines de ilustración de determinadas realizaciones y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de sus procedimientos y aspectos conceptuales.
- 25 Los porcentajes de la solución expresan una relación entre el peso y el volumen, y las proporciones en solución expresan una relación volumen/volumen, a menos que se indique lo contrario. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker a 300, 400 o 500 MHz; las desviaciones químicas (δ) se registran en partes por millón. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo en gel de sílice (SiO₂) de acuerdo con la técnica de cromatografía ultrarrápida de Still (J. Org. Chem., (1978), 43, 2923).
- 30 Las abreviaturas usadas en la presente solicitud, incluyendo en particular en los esquemas y ejemplos ilustrativos siguientes, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Algunas de las abreviaturas usadas son las siguientes: Fe para fenilo, PPh₃ para trifenilfosfina; DME para 1,2-dimetoxietano; EtOAc para acetato de etilo; Et₃N para trietilamina; TMS para trimetilsililo; DCM para diclorometano; Me para metilo; DMF para N,N-dimetilformamida; TBAF para fluoruro de tetrabutilamonio; THF para tetrahidrofuranio; Hex para hexanos; TFA para ácido trifluoroacético; HATU para O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio fosfato; DCE para 1,2-dicloroetano; MeOH para metanol; MeOD para CD₄OD; pTSA o pTsoH para ácido paratoluenosulfónico; y DIEA para diisopropiletilamina.
- 35 Los materiales de partida útiles para sintetizar los compuestos de la presente divulgación son conocidos para los expertos en la técnica y pueden fabricarse fácilmente o están disponibles comercialmente.
- 40 Los procedimientos siguientes que se exponen más adelante se proporcionan para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de las reivindicaciones. Se reconocerá que puede ser necesario preparar dicho compuesto I en el que un grupo funcional se protege usando un grupo protector convencional, después eliminar el grupo protector para proporcionar un compuesto de la presente divulgación. Los detalles concernientes al uso de grupos protectores de acuerdo con la presente divulgación son conocidos para los expertos en la técnica.

Preparación del intermedio 1:**Intermedio 1**

5 En una solución de 1,4-dibromobenceno (4,56 g, 19,33 mmol), carbonato potásico (6,16 g, 44,6 mmol) y ácido 2-vinilfenilborónico (2,2 g, 14,87 mmol) en DME (75 ml) y agua (15 ml) (en un vaso de presión) se introdujeron burbujas de nitrógeno durante 15 minutos. Al vaso se añadió tetrakis(trifenilfosfina) paladio(0) (0,859 g, 0,743 mmol) y se introdujeron burbujas de nitrógeno durante 15 minutos, después la reacción se calentó hasta 90 °C durante la noche. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró parcialmente. El residuo se diluyó en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el material bruto. El material bruto se purificó en Biotage (100 % de hexanos), dando 4'-bromo-2-vinilbifenil (Intermedio 1, 2,43 g, rendimiento del 63 %) como un aceite transparente. RMN de ¹H (500 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 5,22 (dd, J = 10,99, 1,22 Hz, 1H) 5,71 (dd, J = 17,40, 1,22 Hz, 1H) 6,67 (dd, J = 17,40, 10,99 Hz, 1H) 7,20 - 7,25 (m, 3H) 7,31 - 7,40 (m, 2H) 7,52 - 7,58 (m, 2H) 7,62 - 7,67 (m, 1H).

Preparación del intermedio 2:**Intermedio 2**

15

Etapa 1:

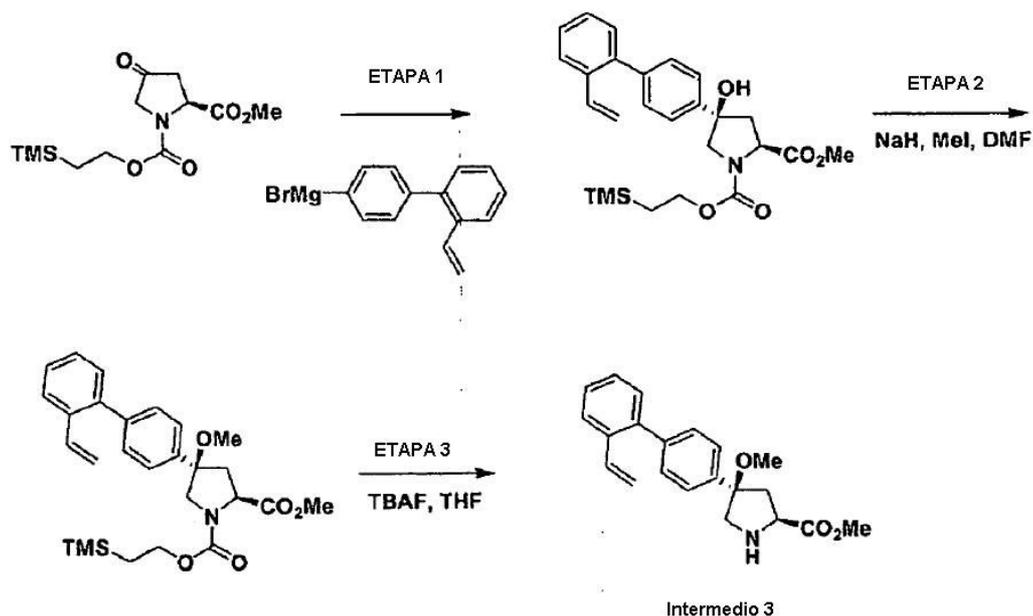
A una solución de 4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato de (2S; 4R)-metilo, sal HCl (,86 g, 54,3 mmol) y trietilamina (18,9 ml, 136 mmol) en acetonitrilo (240 ml) se añadió carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(trimetilsilil)etil y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó con agua y éter. La capa orgánica se lavó con HCl 1,0M (2x) y después con salmuera.

Después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el producto, RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO - *d*) δ ppm 0,05 (s, 9 H) 0,95 (t, J = 8,70 Hz, 1H) 0,98 - 1,13(m, 1H) 1,83 (d, J = 16,79 Hz, 1H) 2,11 (ddd, J = 13,20, 7,86, 4,88 Hz, 1H) 2,20 - 2,39 (m, 1H) 3,58 - 3,71 (m, 1H) 3,75 (d, J = 11,60 Hz, 3H) 4,08 - 4,27 (m, 2H) 4,41 - 4,60 (m, 2H).

Etapa 2:

A una solución de dimetilsulfóxido (13,2 ml, 186 mmol) en DCM (180 ml) a -78 °C se añadió, gota a gota, cloruro de oxalilo (8,9 ml, 93 mmol). La solución formada se agitó a esta temperatura durante 30 minutos. Se añadió una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (12,25 g, 42,3 mmol) en DCM (30 ml) a 78 °C. La suspensión espesa formada se agitó a -78 °C durante 1 hora antes de la adición de trietilamina (29,5 ml, 212 mmol) gota a gota. Esta solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se lavó con HCl 1M y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El aceite marrón claro residual se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (0-33 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (intermedio 2, 9,5 g, rendimiento del 78 %) como aceite naranja. RMN de ¹H (500 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 0,04 - 0,12 (m, 9 H) 0,91 - 1,09 (m, 2H) 2,61 (dd, J = 18,77, 2,59 Hz, 1H) 2,87 - 3,04 (m, 1H) 3,77 (s, 3H) 3,92 (sa, 2H) 4,19 - 4,26 (m, 2H) 4,86 (d, J = 10,07 Hz, 1H)..

35

Preparación del intermedio 3:**Etapa 1:**

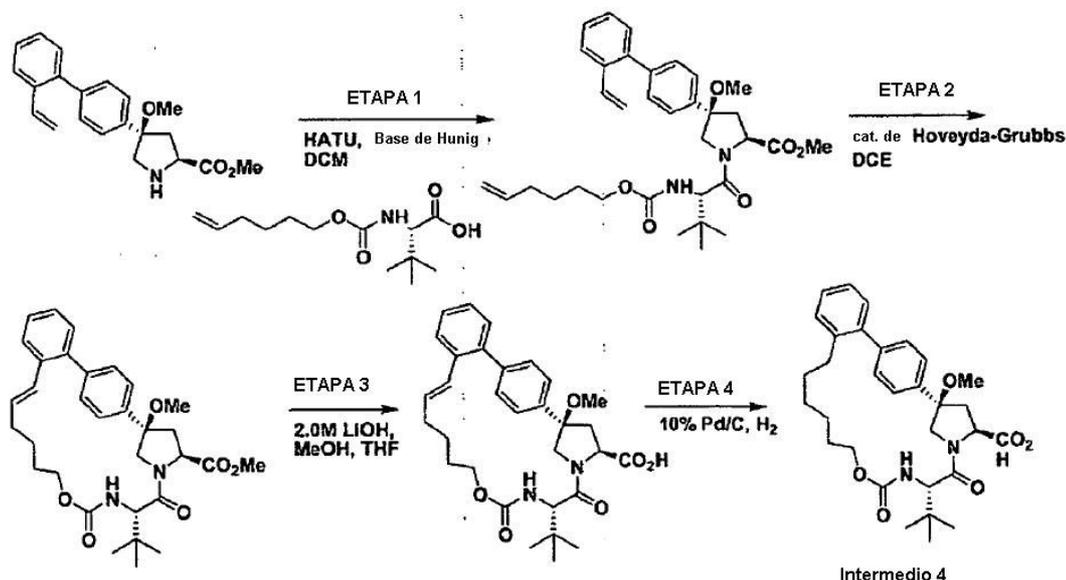
- 5 Virutas de magnesio (0,110 g, 4,58 mmol) se agitaron en un matraz de fondo redondo en nitrógeno durante 30 minutos para producir raspado de la superficie del magnesio. A las virutas de magnesio se añadieron 10 ml de THF y se agitaron durante 30 minutos adicionales. Gota a gota se añadió 4'-bromo-2-vinilbifenilo (Intermedio 1, 1,13 g, 4,36 mmol) en THF (30 ml), gota a gota, a reflujo con agitación enérgica. A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (Intermedio 2, 1,0 g, 3,53 mmol) en tolueno (30 ml) se añadió la solución de Grignard (40 ml) a 0 °C y se agitó durante 1 hora y después se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado. La capa acuosa se extrajo después con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (20-33 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (0,5 g, rendimiento del 30 %) como un aceite amarillo. CLEM: Tr= 1,92 min. [M+Na]⁺ = 490; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,06 (s, 9 H) 0,88 - 1,14 (m, 2H) 2,38 - 2,50 (m, 1H) 2,74 (dd, J = 13,58, 10,22 Hz, 1H) 3,89 (d, J = 11,60 Hz, 2H) 3,76 - 3,84 (m, 1H) 3,86 (s, 3H) 4,00 (dd, 1H) 4,23 (s, 1H) 4,24 - 4,28 (m, 1H) 4,55 - 4,66 (m, 1H) 5,20 (dd, J = 10,99, 1,22 Hz, 1H) 5,71 (dd, J = 17,55, 1,07 Hz, 1H) 6,70 (dd, J = 17,40, 10,99 Hz, 1H) 7,28 (dd, 1H) 7,34 (dd, J = 7,17, 1,68 Hz, 1H) 7,37 (d, J = 8,55 Hz, 2H) 7,54 (d, J = 8,24 Hz, 2H) 7,65 (d, J = 7,32 Hz, 1H).

Etapa 2:

- 25 A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (0,5 g, 1,069 mmol) y yoduro de metilo (0,12 ml, 1,925 mmol) a 0 °C en DMF se añadió hidruro sódico (60 % en aceite) (0,08 g, 1,925 mmol). Esto se agitó a 0 °C durante 3 horas. Después, la reacción se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado y éter. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (20-40 % de EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (160 mg, rendimiento del 31 %) como un aceite transparente. CLEM: Tr= 2,11 min. [M+Na]⁺ = 504; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo 90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,04 - 0,13 (m, 9 H) 0,95 - 1,02 (m, 1H) 1,03 - 1,08 (m, 1H) 2,55 (dd, J = 13,12, 8,85 Hz, 1H) 2,76 - 2,89 (m, 1H) 3,00 (s, 3H) 3,68 - 3,77 (m, 1H) 3,78 (s, 3H) 3,96 - 4,09 (m, 1H) 4,20 - 4,31 (m, 2H) 4,64 (dd, J = 8,70, 1,98 Hz, 1H) 5,22 (d, J = 11,90 Hz, 1H) 5,72 (d, J = 17,40 Hz, 1H) 6,69 (ddd, J = 17,40, 10,99, 2,44 Hz, 1H) 7,29 (d, J = 7,32 Hz, 1H) 7,32 - 7,45 (m, 6 H) 7,66 (d, J = 7,32 Hz, 1H).

Etapa 3:

A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (100 mg, 0,208 mmol) en THF (2 ml) a temperatura ambiente se añadió fluoruro de tetrabutilamonio y se agitó a esta temperatura durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (Intermedio 3, 630 mg, rendimiento del 100 %), que se usó directamente en las siguientes etapas sin purificación adicional. CLEM: Tr= 1,14 min. [M+Na]⁺ = 360; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,51 (dd, J = 13,58, 9,61 Hz, 1H) 2,71 (dt, J = 13,73, 2,44 Hz, 1H) 2,99 (s, 3H) 3,09 (d, J = 12,21 Hz, 1H) 3,30 - 3,43 (m, 1H) 3,56 (dd, J = 12,21, 2,14 Hz, 1H) 3,81 (s, 3H) 3,97 (dd, J = 9,77, 2,75 Hz, 1H) 5,21 (dd, J = 10,99, 1,22 Hz, 1H) 5,72 (dd, J = 17,70, 1,22 Hz, 1H) 6,71 (dd, J = 17,70, 10,99 Hz, 1H) 7,27 - 7,31 (m, 1H) 7,33 - 7,42 (m, 6 H) 7,60 - 7,72 (m, 1H).

15 **Preparación del intermedio 4:**

Etapa 1:

A una solución de ácido (S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (128 mg, 0,498 mmol), DIEA (0,174 ml, 0,996 mmol) y 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (112 mg, 0,332 mmol) en DCM (5 ml) se añadió HATU (112 mg, 0,332 mmol) en DCM (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se evaporó y se purificó en Biotage (10-40 % de EtOAc en hexanos) para dar 1-((S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (151 mg, rendimiento del 79 %) como un aceite transparente. CLEM: Tr= 2,05 min. [M+Na]⁺ = 599; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

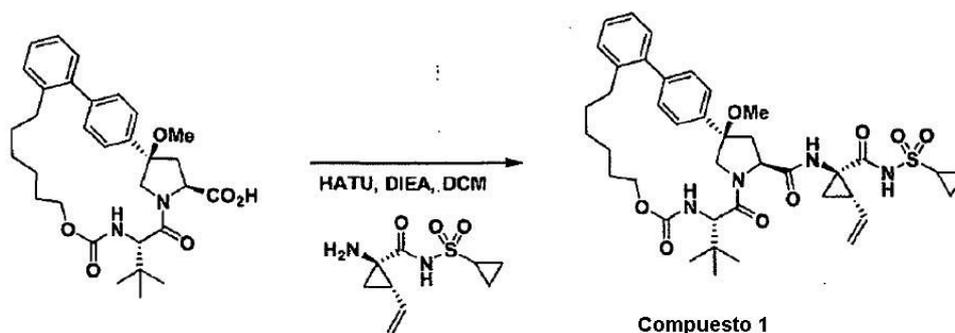
1-((S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (151 mg, 0,262 mmol) se disolvió en DCE (26 ml) y se introdujeron burbujas de gas nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (16 mg, 0,026 mmol) y se calentó en un baño de aceite a 80 °C durante 2 horas y después se concentró en el rotovap. El producto bruto se purificó en Biotage (10 - 50 % de EtOAc en hexanos), dando el producto (121 mg, rendimiento del 84 %) en forma de una espuma blanca. CLEM: Tr= 1,91 min. [M+Na]⁺ = 571; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

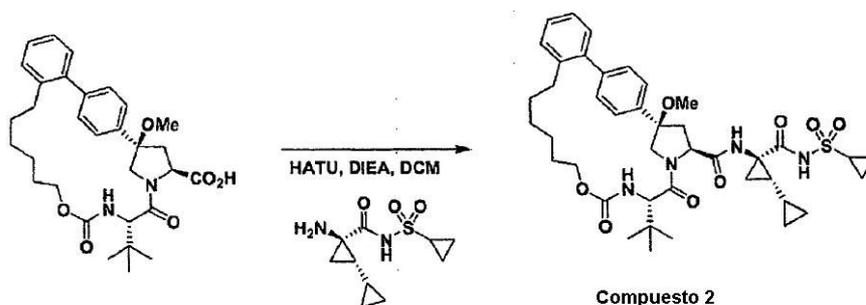
A una solución del producto de la etapa 2 (121 mg, 0,221 mmol) en THF (2 ml) y metanol (2 ml) se añadió hidróxido de litio 2,0M (0,33 ml, 0,662 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con éter dietílico, se lavó con HCl 1M y salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el producto bruto. CLEM: Tr= 1,69 min. [M+Na]⁺ = 557; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

Al producto de la etapa 3 (124 mg, 0,232 mmol) en EtOAc (3 ml) se añadió 10 % de paladio sobre carbono (25 mg, 0,023 mmol) y se agitó en atmósfera de hidrógeno durante la noche. La reacción se filtró mediante una frita de 0,45 um Millipore millex-HV y se evaporó para dar el intermedio 4 (121 mg, rendimiento del 97 %). CLEM: Tr= 1,68 min. [M+Na]⁺ = 559; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Preparación del Compuesto 1:

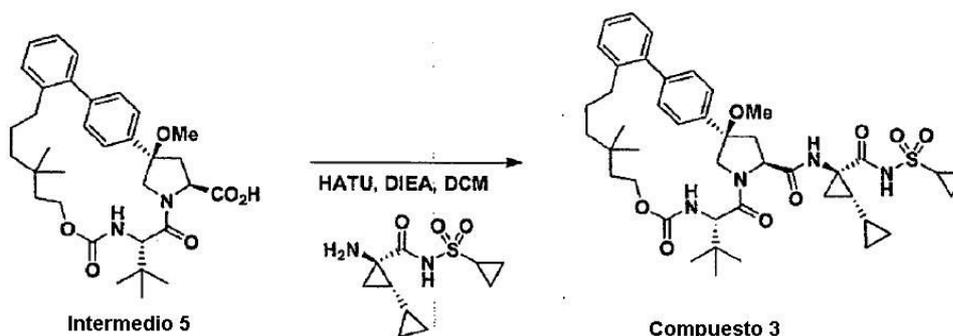
A una solución del intermedio 4 (80 mg, 0,149 mmol), base de Hunig (,078 ml, 0,447 mmol) y (1R,2S)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de ácido p-toluenosulfónico (90 mg, 0,224 mmol) en DCM (2 ml) se añadió HATU (63 mg, 0,164 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto bruto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42ml/mm; gradiente del disolvente 70: 30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 101 mM)), dando el compuesto 1 (32 mg, rendimiento del 29 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 1,91 min. [M+Na]⁺ = 771; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,94 - 1,01 (m, 2H) 1,04 (s, 9 H) 1,10 - 1,22 (m, 2H) 1,12 - 1,23 (m, 1H) 1,12 - 1,23 (m, 3H) 1,28 - 1,37 (m, 4H) 1,39 - 1,50 (m, 2H) 1,95 (t, J = 6,78 Hz, 1H) 2,09 (sa, 1H) 2,51 (br, s, 1H) 2,61 - 2,71 (m, 2H) 2,95 (sa, 1H) 3,10 (s, 3H) 3,65 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 3,73 - 3,87 (m, 1H) 4,05 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,17 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,43 (d, J = 9,79 Hz, 1H) 4,48 - 4,62 (m, 1H) 4,88 (d, J = 9,03 Hz, 1H) 5,19 (d, J = 8,78 Hz, 1H) 5,31 (d, J = 17,32 Hz, 1H) 5,77 (d, J = 10,29 Hz, 2H) 7,15 7,34 (m, 5 H) 7,34 - 7,49 (m, 3H).

Preparación del Compuesto 2:

A una solución del intermedio 4 (40 mg, 0,075 mmol), base de Hunig (0,039 ml, 0,224 mmol) y (1R,2S)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (31 mg, 0,112 mmol) en DCM (1,5 ml) se añadió

HATU (32 mg, 0,082 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto bruto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42ml/min; gradiente del disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 2 (26mg, rendimiento del 44 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 1,94 min. $[M+Na]^+$ = 785; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220 nm. RMN de 1H (400 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,33 (d, J = 9,29 Hz, 1H) 0,36 - 0,45 (m, 1H) 0,50 - 0,67 (m, 2H) 0,75 - 0,87 (m, 1H) 0,89 (t, J = 6,78 Hz, 2H) 1,04 (s, 9 H) 1,11 - 1,21 (m, 4 H) 1,21 - 1,31 (m, 4 H) 1,31 - 1,46 (m, 4 H) 1,41 - 1,52 (m, 1H) 1,79 (dd, J = 7,91, 5,65 Hz, 1H) 2,42 - 2,59 (m, 1H) 2,59 - 2,68 (m, 2H) 2,68 - 2,79 (m, 1 H) 2,89 - 3,04 (m, 1H) 3,06 (s, 3H) 3,15 (d, 1H) 3,61 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 3,75 - 3,85 (m, 1H) 3,93 (d, 1H) 4,04 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,15 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 4,40 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,49 - 4,57 (m, 1H) 7,15 - 7,34 (m, 5 H) 7,34 - 7,48 (m, 3H).

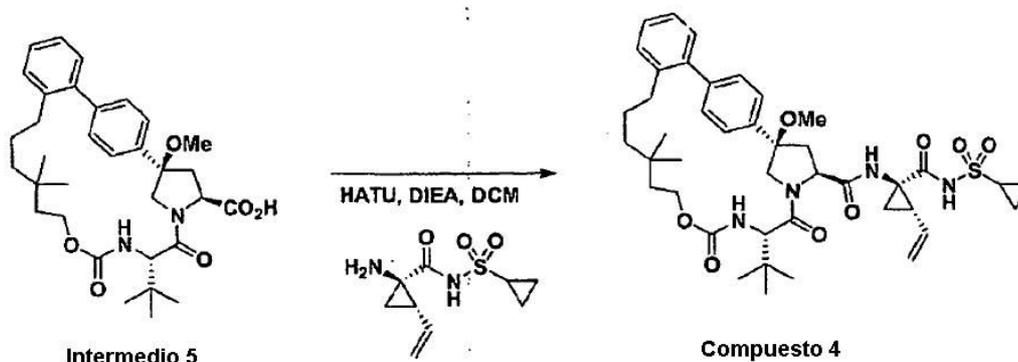
Preparación del Compuesto 3:



El intermedio 5 (fabricado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 4) (100 mg, 0,177 mmol), DIEA (0,093 ml, 0,531 mmol) y HATU (74 mg, 0,195 mmol) se añadieron a una solución de (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal TFA (79 mg, 0,221 mmol) en DCM (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El producto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42 ml/min; gradiente de disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 3 (66 mg, 0,079 mmol, rendimiento del 45 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 2,05 min. $[M+Na]^+$ = 813; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220 nm. RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,150-0,29 (m, 2H) 0,39 - 0,54 (m, 2H) 0,59 - 0,72 (m, 2H) 0,79 (s, 3H) 0,81 (s, 3H) 0,90 - 0,95 (m, 2H) 0,98 (s, 9 H) 1,02 - 1,20 (m, 6 H) 1,20 - 1,33 (m, 2H) 1,46 - 1,54 (m, 1H) 1,54 - 1,62 (m, 1H),

2,27 - 2,39 (m, 1H) 2,40 - 2,47 (m, 2H) 2,88 - 2,99 (m, 1H) 3,02 (s, 3H) 3,75 (td, J = 10,45, 5,04 Hz, 1H) 3,88 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 3,99 (t, J = 8,24 Hz, 1H) 4,02 - 4,13 (m, 1H) 4,33 (d, J = 9,77 Hz, 1H) 4,40 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 7,19 (d, 1H) 7,26 (td, J = 6,64, 2,90 Hz, 2H) 7,28 - 7,32 (m, 2H) 7,33 - 7,39 (m, 4 H) 7,54 (d, J = 9,77 Hz, 1H) 8,49 (sa, 1H) 10,35 (s, 1H).

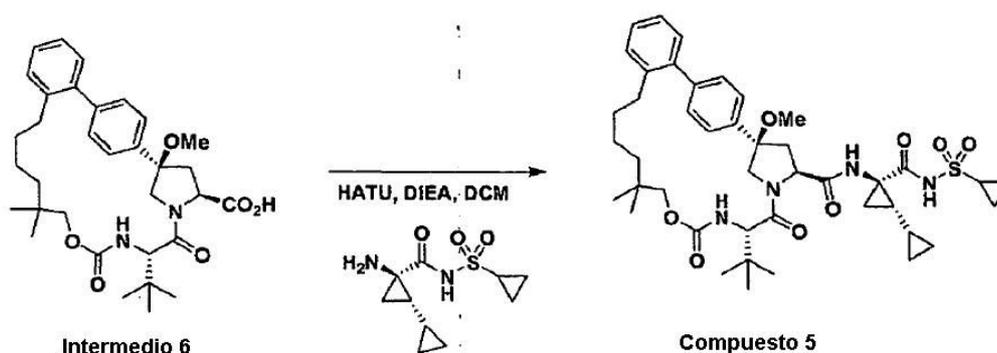
Preparación del Compuesto 4:



El intermedio 5 (fabricado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 4) (70 mg, 0,124 mmol), DIEA (0,065 ml, 0,372 mmol) y HATU (52 mg, 0,136 mmol) se añadieron a una solución de (1S,2R)-1-amino-N-

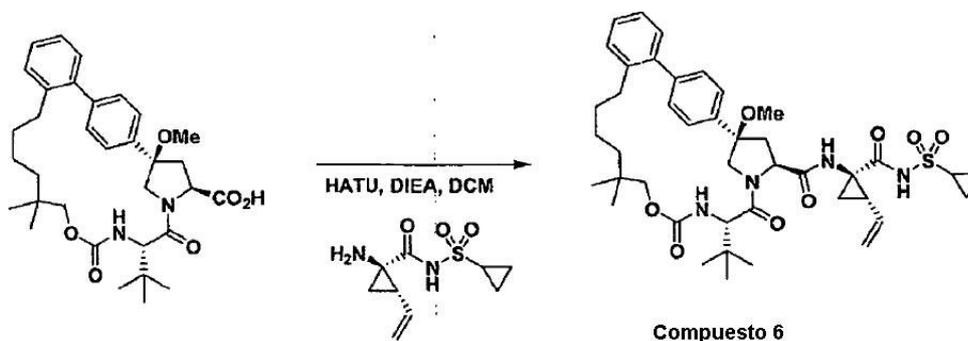
(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de pTSA (74,8 mg, 0,221 mmol) en DCM (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El producto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42 ml/min; gradiente de disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 4 (26 mg, 0,032 mmol, rendimiento del 26 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 2,03 min. $[M+Na]^+$ = 799; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220 nm. RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,71 (sa, 3H) 0,84 (d, J = 6,41 Hz, 3H) 0,87 - 0,95 (m, 1H) 0,98 - 1,05 (m, 2H) 1,08 (d, J = 5,49 Hz, 9 H) 1,21 (br, s, 1H) 1,26 (s, 1H) 1,29 - 1,40 (m, 2H) 1,40 - 1,49 (m, 2H) 1,94 (dd, J = 8,09, 5,95 Hz, 1H) 2,04 - 2,13 (m, 1H) 2,34 - 2,45 (m, 1H) 2,52 (sa, 1H) 2,57 - 2,67 (m, 2H) 2,69 - 2,79 (m, 1H) 2,93 (sa, 1H) 3,14 (s, 3H) 3,20 - 3,27 (m, 1H) 3,65 (d, J = 9,16 Hz, 1H) 3,78 - 3,91 (m, 2H) 3,92 - 4,03 (m, 1H) 4,03 - 4,10 (m, 1H) 4,11 - 4,20 (m, 1H) 4,23 - 4,34 (m, 1H) 4,43 - 4,58 (m, 1H) 4,88 (d, J = 8,24 Hz, 1H) 5,09 - 5,22 (m, 1H) 5,27 (sa, 1H) 5,64 - 5,83 (m, 1H) 7,23 (sa, 1H) 7,28 - 7,31 (m, 3H) 7,33 (d, J = 10,07 Hz, 2H) 7,41 - 7,50 (m, 2H).

15 Preparación del Compuesto 5:



A una solución del intermedio 6 (fabricado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 4) (50 mg, 0,089 mmol) in DCM (1 ml) se añadieron (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de TFA (0,111 g, 0,111 mmol), DIEA (0,046 ml, 0,266 mmol) y HATU (37 mg, 0,097 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El producto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42 ml/min; gradiente de disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 5 (15 mg, 0,017 mmol, rendimiento del 20 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 2,04 min. $[M+Na]^+$ = 813; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,25 - 0,37 (m, 2H) 0,59 (d, J = 8,85 Hz, 2H) 0,77 (s, 3H) 0,80 (s, 2H) 0,88 (s, 3H) 1,03 (s, 9 H) 1,06 (sa, 2H) 1,17 (sa, 2H) 1,28 (dd, J = 9,31, 5,65 Hz, 1H) 1,40 (d, J = 4,58 Hz, 2H) 1,84 (dd, J = 7,93, 5,80 Hz, 1H) 2,41 (sa, 1H) 2,59 - 2,69 (m, 1H) 2,69 - 2,78 (m, 1H) 2,97 (sa, 1H) 3,11 (s, 3H) 3,17 - 3,25 (m, 1H) 3,20 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 3,41 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 3,67 (s, 1H) 3,85 (d, J = 11,60 Hz, 1H) 3,98 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 4,13 (d, J = 10,07 Hz, 1H) 4,27 - 4,43 (m, 3H) 4,91 (s, 1H) 5,35 (sa, 1H) 6,81 (s, 1H) 7,19 - 7,24 (m, 2H) 7,28 - 7,46 (m, 6 H) 9,95 (sa, 1H).

Preparación del Compuesto 6:



35 El intermedio 6 (fabricado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 4) (15 mg, 0,027 mmol), DIEA (0,014 ml, 0,080 mmol) y HATU (11 mg, 0,029 mmol) se añadieron a una solución de (1S,2R)-1-amino-N-

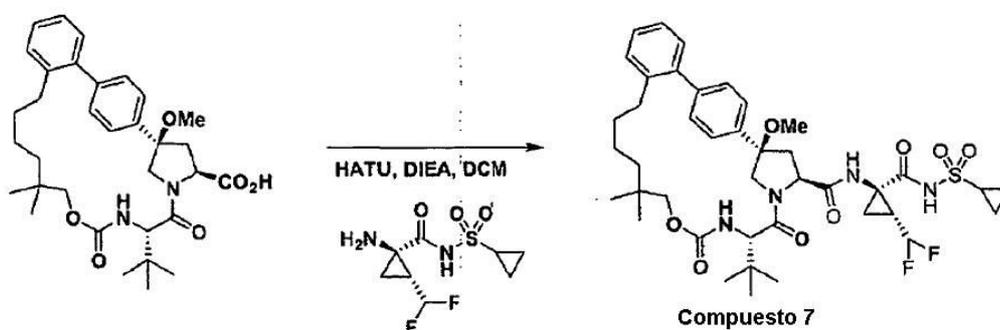
(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de pTSA (16 mg, 0,040 mmol) en DCM (0,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El producto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42 ml/min; gradiente de disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 6 (8,5 mg, 0,011 mmol, rendimiento del 40 %) como un sólido blanco.

5 CLEM: Tr= 2,03 min. $[M+Na]^+$ = 799; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,76 (s, 3H) 0,78 (s, 1H) 0,87 (s, 3H) 0,92 (sa, 1H) 1,02 (sa, 4H) 1,03 (s, 9H) 1,14 - 1,21 (m, 2H) 1,30 - 1,40 (m, 2H) 1,47 - 1,53 (m, 1H) 1,88 - 2,01 (m, 1H) 2,05

10 (sa, 1H) 2,22 (m, 1H) 2,35 - 2,46 (m, 1H) 2,47 - 2,56 (m, 1H) 2,56 - 2,64 (m, 1H) 2,68 - 2,78 (m, 2H) 2,90 (sa, 1H) 3,11 (s, 3H) 3,19 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 3,46 (s, 1H) 3,65 (sa, 1H) 3,79 - 4,18 (m, 1H) 4,26 - 4,38 (m, 2H) 4,41 (d, J = 10,38 Hz, 1H).

5,16 (d, J = 10,99 Hz, 1H) 5,28 (d, J = 17,09 Hz, 1H) 5,47 (sa, 1H) 6,87 (sa, 1H) 7,23 (d, J = 8,85 Hz, 2H) 7,28 (sa, 2H) 7,31 - 7,48 (m, 4 H).

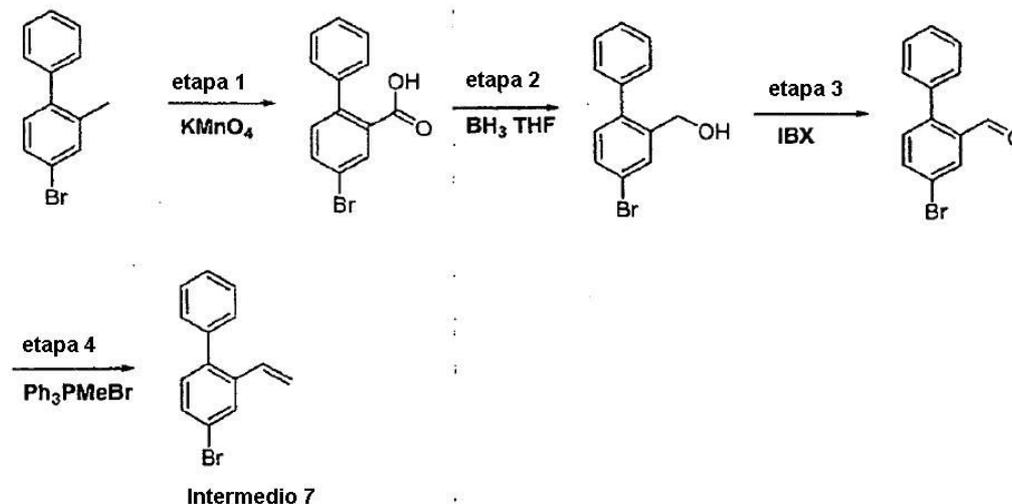
15 Preparación del Compuesto 7:



El intermedio 6 (fabricado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 4) (15 mg, 0,027 mmol), DIEA (0,014 ml, 0,080 mmol) y HATU (11 mg, 0,029 mmol) se añadieron a una solución de (1R,2R)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonil)-2-(difluorometil)ciclopropanocarboxamida, sal de HCl (11 mg, 0,040 mmol) en DCM (0,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El producto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42 ml/min; gradiente de disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 7 (9 mg, 0,010 mmol, rendimiento del 37 %) como un sólido blanco.

20 CLEM: Tr= 2,03 min. $[M+Na]^+$ = 823; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,78 (s, 3H) 0,82 (sa, 2H) 0,90 (s, 3H) 0,98 - 1,03 (m, 1H) 1,06 (s, 9H) 1,16 - 1,28 (m, 2H) 1,32 - 1,48 (m, 3H) 1,63 - 1,73 (m, 1H) 1,87 - 1,98 (m, 1H) 2,14 (sa, 1H) 2,38 - 2,46 (m, 1H) 2,46 - 2,56 (m, 1H) 2,64 - 2,81 (m, 2H) 2,93 (sa, 1H) 3,12 (s, 3H) 3,22 (d, J = 10,07 Hz, 1H) 3,68 (sa, 1H) 4,02 (d, J = 10,99 Hz, 1H) 4,12 - 4,29 (m, 1H) 4,32 - 4,40 (m, 1H) 4,40 - 4,46 (m, 1H) 5,34 (sa, 1H) 5,76 - 6,16 (m, 1H) 6,66 (sa, 1H) 7,16 - 7,27 (m, 2H) 7,28 - 7,33 (m, 2H) 7,37 (m, 4H) 7,42 (s, 1H).

30

Preparación del intermedio 7:**Etapa 1:**

5 El compuesto 4-bromo-2-metilbifenilo (5 g, 20,23 mmol) se suspendió en piridina (23 ml) y agua (35 ml). Se añadió permanganato de potasio (16 g, 101 mmol) en porciones durante un periodo de 20 minutos. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió y el MnO_2 se eliminó mediante filtración. Al filtrado se añadió HCl concentrado hasta que el producto precipitó. El producto se extrajo con DCM, se lavó con agua y salmuera, se recogió, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, dando ácido 4-bromobifenil-2-carboxílico (5 g, 4 mmol, 0,04 mmol, rendimiento del 89 %) en forma de un sólido blanco: CLEM: Tr= 1,39 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

15 El ácido 4-bromobifenil-2-carboxílico (5,71 g, 20,61 mmol) se disolvió en THF (50 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Gota a gota se añadió complejo de borano tetrahidrofurano 1,0M (41,2 ml, 41,2 mmol) durante 15 minutos y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua, cloruro amónico saturado y después salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó, para dar el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante columna ultrarrápida en Biotage (5-35 % EtOAc: Hex) para dar (4-bromobifenil-2-il)metanol (3,5 g, 13,30 mmol, rendimiento del 65 %) como un aceite de color naranja claro. CLEM: Tr= 1,43 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220. RMN de 1H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 4,60 (d, J = 5,77 Hz, 2H) 7,15 (d, J = 8,28 Hz, 1H) 7,29 - 7,35 (m, 2H) 7,36 - 7,46 (m, 3H) 7,48 (dd, J = 8,28, 2,01 Hz, 1H) 7,75 (d, J = 2,01 Hz, 1H).

Etapa 3:

25 A (4-bromobifenil-2-il)metanol (3,5 g, 13,30 mmol) en DMSO (40 ml) se añadió IBX (7,45 g, 26,6 mmol) y se agitó a 60 °C durante 2 horas. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se diluyó con agua y éter dietílico. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó, para dar 4-bromobifenil-2-carbaldehído (3,32 g, 12,71 mmol, rendimiento del 96 %) como un aceite naranja. CLEM: Tr= 1,66 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220. RMN de 1H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 7,29 - 7,39 (m, 3H) 7,43 - 7,58 (m, 3H) 7,76 (dd, J = 8,16, 2,13 Hz, 1H) 8,15 (d, J = 2,01 Hz, 1H) 9,91 (s, 1H).

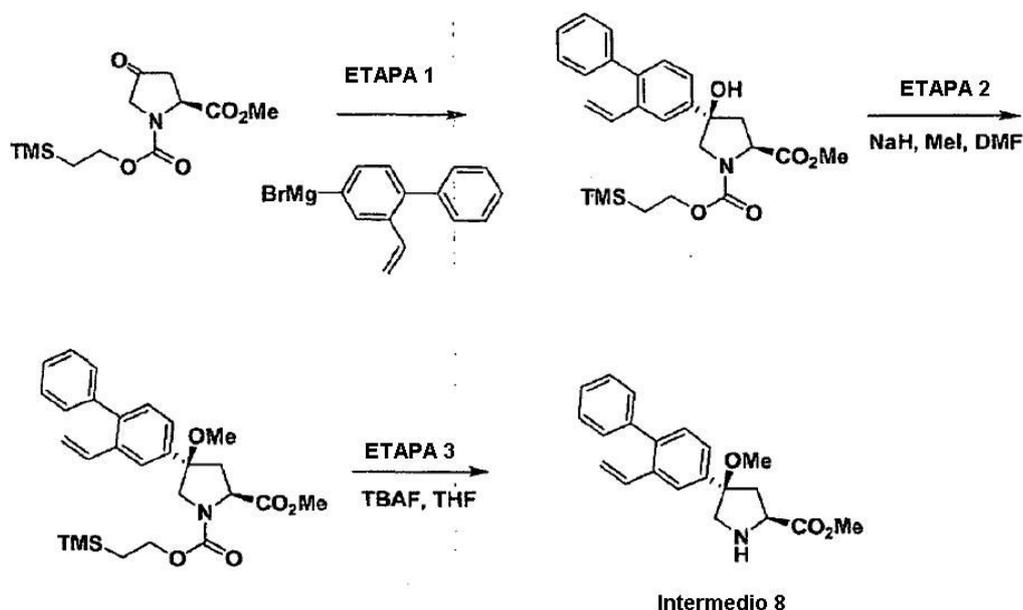
Etapa 4:

35 A una solución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (9,1 g, 25,4 mmol) en THF (60 ml) se añadió hidruro sódico (2,034 g, 50,9 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. Gota a gota se añadió una solución de 4-bromobifenil-2-carbaldehído (3,32 g, 12,71 mmol) en THF (60 ml) a 0 °C. La mezcla se agotó durante la noche de 0° C hasta la temperatura ambiente. La reacción se filtró y se evaporó. El residuo se diluyó con éter dietílico y se lavó con agua y después con salmuera. La capa de éter se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (100 % de hexanos), dando 4-bromo-2-

40

vinilbifenil (Intermedio 7, 2,5 g, 9,65 mmol, rendimiento del 76 %) como un líquido naranja claro. RMN de ^1H (500 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 5,24 (d, $J = 11,90$ Hz, 1H) 5,71 (d, $J = 17,40$ Hz, 1H) 6,64 (dd, $J = 17,40, 10,99$ Hz, 1H) 7,17 (d, $J = 8,24$ Hz, 1H) 7,29 - 7,34 (m, 2H) 7,34 - 7,39 (m, 1H) 7,42 (d, $J = 7,63$ Hz, 2H) 7,45 (dd, $J = 8,09, 1,98$ Hz, 1H) 7,77 (d, $J = 1,83$ Hz, 1H).

5 Preparación del intermedio 8:



Etapa 1:

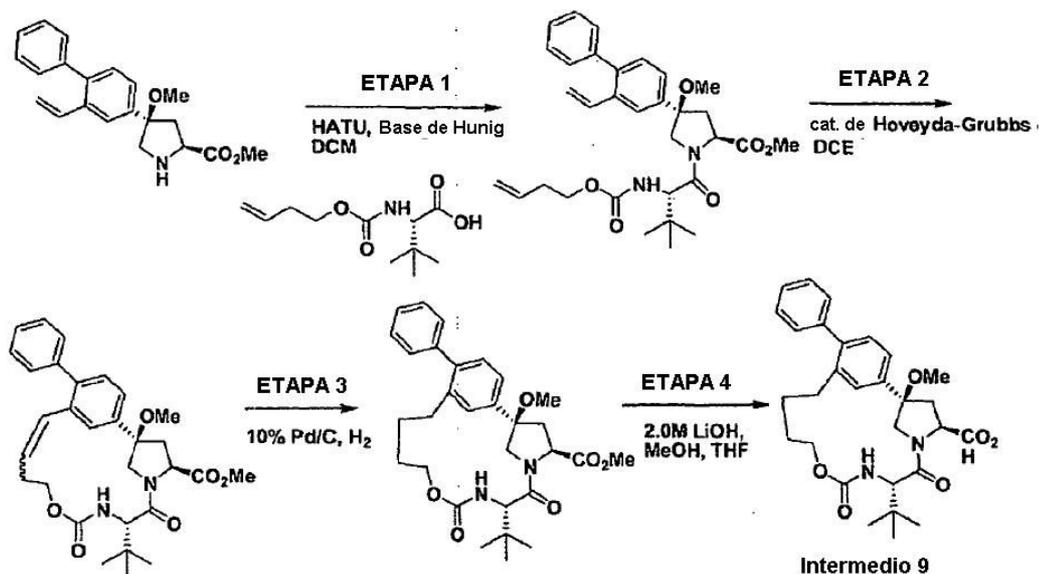
A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (2,7 g, 9,38 mmol) en tolueno (75 ml) a 0 °C se añadió una solución de bromuro de (2-vinilbifenil-4-il)magnesio (2,66 g, 9,38 mmol) fabricado mediante reflujo del intermedio 7 con 1 eq. de virutas de magnesio en THF y se agitó durante 1 hora y después se inactivó con una solución de NH_4Cl saturado. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se evaporaron, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (20-33 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (800 mg, 1,711 mmol, rendimiento del 18 %). CLEM: Tr= 1,85 min. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 490$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (1,55 g, 3,31 mmol) y yoduro de metilo (0,373 ml, 5,97 mmol) a 0 °C en DMF se añadió NaOH (60 % en aceite) (0,239 g, 5,97 mmol) y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después, la reacción se inactivó con una solución de NH_4Cl saturado y éter. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (20-40 % de EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (0,5 g, 1,038 mmol, rendimiento del 31 %) como un aceite transparente. CLEM: Tr= 2,11 min. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 504$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = -0,1 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (500 mg, 1,038 mmol) en THF (5 ml) se añadió TBAF (1,0 M en THF, 4,1 ml, 4,1 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó en rotovap para dar 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (Intermedio 8, 360 mg, 1,067 mmol, rendimiento del 100 %). CLEM: Tr= 2,03 min. $[\text{M}-\text{MeOH}] = 305$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Preparación del intermedio 9:**Etapa 1:**

5 A una solución de 4-metoxi-4-(2-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (115 mg, 0,341 mmol) en DCM (4 ml) se añadió ácido (S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (117 mg, 0,511 mmol), DIEA (0,179 ml, 1,022 mmol) y HATU (143 mg, 0,375 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se evaporó y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (0-40 % de EtOAc :
 10 hexanos) para dar 1-((S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (150 mg, 0,273 mmol, rendimiento del 80 %) como una espuma blanca. CLEM: Tr= 1,89 min. [M+Na]⁺ = 571; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

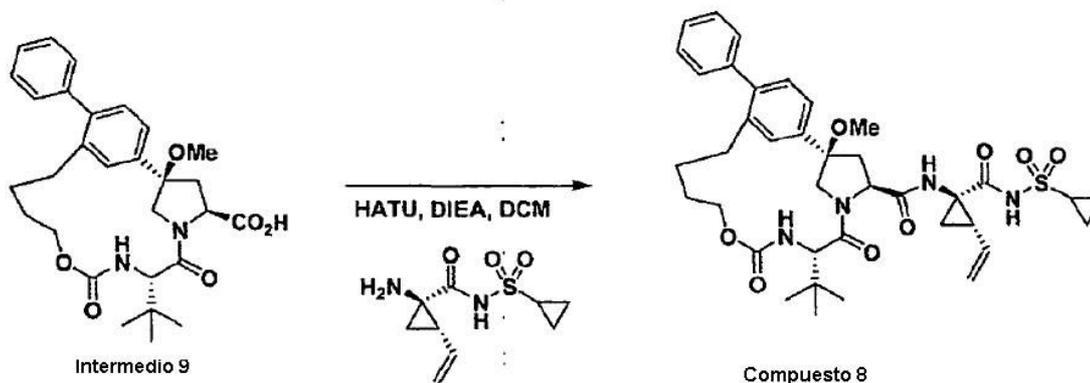
15 1-((S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (150 mg, 0,273 mmol) se disolvió en DCE (29 ml) y se introdujeron burbujas de gas nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (2^a generación) (17 mg, 0,027 mmol) y se calentó en un baño de aceite a 80 °C durante 2 horas. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 -
 20 50 % de EtOAc/hexanos), dando el producto (123 mg, 0,236 mmol, rendimiento del 86 %) en forma de una espuma blanca. CLEM: Tr= 1,78 min. [M+Na]⁺ = 543; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

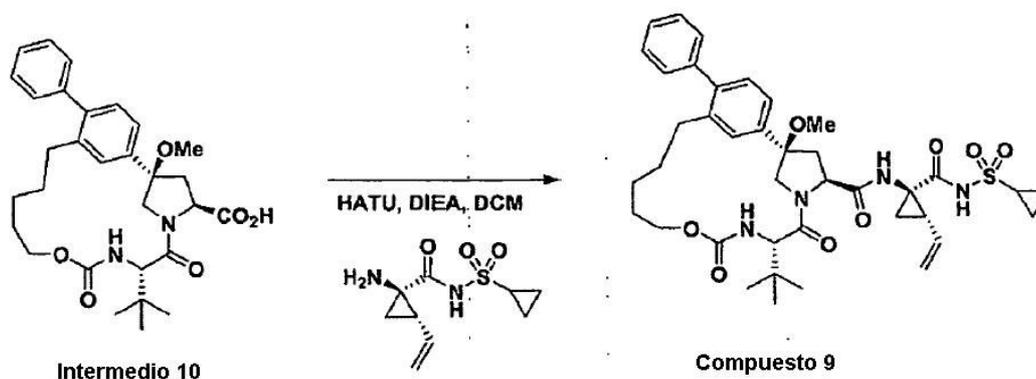
25 El producto de la etapa 2 (123 mg, 0,236 mmol) en acetato de etilo (4 ml) se trató con 10 % de paladio sobre carbono (25 mg, 0,024 mmol) y se agitó bajo un globo de hidrógeno durante la noche. La reacción se filtró mediante un tapón de 0,45 μm Millipore millex-HV y se evaporó para dar el producto (113 mg, 0,216 mmol, rendimiento del 92 %). CLEM: Tr= 1,83 min. [M+Na]⁺ = 545; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.
 30

Etapa 4:

35 Una solución de hidróxido de litio (0,324 ml, 0,649 mmol) se añadió a una solución del producto de la etapa 3 (113 mg, 0,216 mmol) en THF (1 ml) y MeOH (1,000 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con HCl 1M, después con salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el intermedio 9 (103 mg, 0,203 mmol, rendimiento del 94 %). CLEM: Tr= 1,60 min. [M+Na]⁺ = 531; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

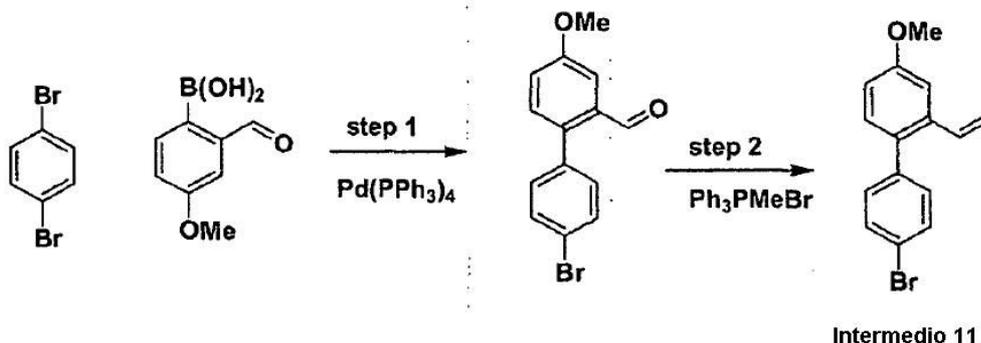
Preparación del Compuesto 8:

El intermedio 9 (15 mg, 0,029 mmol), DIEA (0,015 ml, 0,088 mmol) y HATU (12 mg, 0,032 mmol) se añadieron a una solución de (1S,2R)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de pTSA (14 mg, 0,035 mmol) en DCM (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto bruto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42ml/min; gradiente del disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 8 (7 mg, 9,29 μ mol, rendimiento del 32 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 1,80 min. $[M+Na]^+$ = 743; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,99 - 1,07 (m, 2H) 1,11 (s, 9 H) 1,13 - 1,19 (m, 1H) 1,26 - 1,34 (m, 2H) 1,35 - 1,40 (m, 2H) 1,48 (dd, J = 8,85, 5,49 Hz, 2H) 1,74 - 1,86 (m, 1H) 1,96 (dd, J = 7,78, 5,65 Hz, 1H) 2,00 - 2,07 (m, 1H) 2,29 - 2,42 (m, 1H) 2,60 (s, 1H) 2,86 (sa, 1H) 2,90 - 2,97 (m, 1H) 3,12 (s, 3H) 3,67 - 3,73 (m, 1H) 3,77 (d, J = 10,38 Hz, 2H) 4,70 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 4,95 (s, 1H) 5,01 - 5,10 (m, 1H) 5,13 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 5,22 (d, J = 17,09 Hz, 1H) 5,53 (sa, 1H) 5,70 - 5,88 (m, 1H) 6,44 (sa, 1H) 7,24 (d, J = 7,63 Hz, 2H) 7,28 - 7,32 (m, 2H) 7,34 - 7,40 (m, 2H) 7,40 - 7,45 (m, 2H).

Preparación del Compuesto 9:

A una solución de (1S,2R)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de pTSA (14 mg, 0,034 mmol) en DCM (1 ml) se añadió el intermedio 10 (preparado usando procedimientos análogos a la síntesis del intermedio 9) (15 mg, 0,029 mmol), DIEA (0,015 ml, 0,086 mmol) y HATU (12 mg, 0,032 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto bruto se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. (Sunfire Prep C18 OBD 5u (30x100mm); caudal= 42ml/min; gradiente del disolvente 70:30 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)), dando el compuesto 9 (8,5 mg, 10,99 μ mol, rendimiento del 38 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 1,82 min. $[M+Na]^+$ = 757; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,99 - 1,07 (m, 2H) 1,11 (s, 9 H) 1,13 - 1,19 (m, 1H) 1,26 - 1,34 (m, 2H) 1,35 - 1,40 (m, 2H) 1,48 (dd, J = 8,85, 5,49 Hz, 2H) 1,74 - 1,86 (m, 1H) 1,96 (dd, J = 7,78, 5,65 Hz, 1H) 2,00 - 2,07 (m, 1H) 2,29 - 2,42 (m, 1H) 2,60 (s, 1H) 2,86 (sa, 1H) 2,90 - 2,97 (m, 1H) 3,12 (s, 3H) 3,67 - 3,73 (m, 1H) 3,77 (d, J = 10,38 Hz, 2H) 4,70 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 4,95 (s, 1H) 5,01 - 5,10 (m, 1H) 5,13 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 5,22 (d, J = 17,09 Hz, 1H) 5,53 (sa, 1H) 5,70 - 5,88 (m, 1H) 6,44 (sa, 1H) 7,24 (d, J = 7,63 Hz, 2H) 7,28 - 7,32 (m, 2H) 7,34 - 7,40 (m, 2H) 7,40 - 7,45 (m, 2H).

Preparación del intermedio 11:



Etapa 1:

5 En una solución de 1,4-dibromobenceno (5,11 g, 21,67 mmol), carbonato potásico (6,91 g, 50,0 mmol) y ácido 2-formilmetoxifenilborónico (3 g, 16,67 mmol) en DME (75 ml) y agua (15 ml) (en un vaso de presión) se roció nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió Pd(Ph₃P)₄ (0,578 g, 0,500 mmol) y después la reacción se calentó hasta 90 °C durante la noche. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se evaporó en rotovap. El residuo se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5 - 15 % de EtOAc/hexanos), dando 4'-bromo-4-metoxibifenil-2-carbaldehído (2,72 g, 9,34 mmol, rendimiento del 56 %) en forma de un sólido blanco. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 3,91 (s, 3H) 7,18 - 7,26 (m, 3H) 7,34 (d, J = 8,24 Hz, 1H) 7,52 (d, J = 2,75 Hz, 1H) 7,54 - 7,70 (m, 2H) 9,94 (s, 1H).

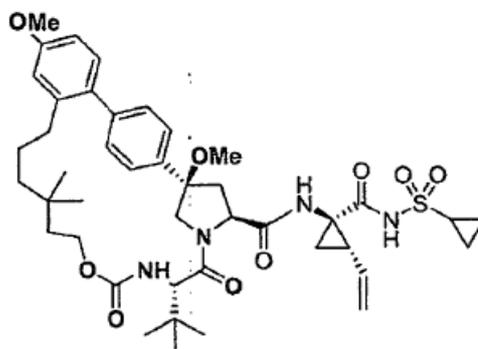
10

Etapa 2:

15 A una solución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (6,67 g, 18,69 mmol) en THF (30 ml) se añadió hidruro sódico (60 % en aceite, 1,5 g, 37,4 mmol) La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. Gota a gota se añadió una solución de 4'-bromo-4-metoxibifenil-2-carbaldehído (2,72 g, 9,34 mmol) en THF (30 ml) a 0 °C. La mezcla se agotó durante la noche de 0 °C hasta la temperatura ambiente. La reacción se filtró y se evaporó. El residuo se diluyó con éter dietílico y se lavó con agua y después con salmuera. La capa de éter se recogió, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5 - 15 % de EtOAc/hexanos), dando 4'-bromo-4-metoxi-2-vinilbifenil (intermedio 11, 2,35 g, 8,13 mmol, rendimiento del 87 %) en forma de un aceite transparente. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 3,88 (s, 3H) 5,23 (dd, J = 10,92, 1,13 Hz, 1H) 5,70 (dd, J = 17,44, 1,13 Hz, 1H) 6,66 (dd, J = 17,44, 10,92 Hz, 1H) 6,90 (dd, J = 8,41, 2,63 Hz, 1H) 7,16 (d, J = 2,5 Hz, 1H) 7,17 - 7,22 (m, 3H) 7,49 - 7,57 (m, 2H).

20

Compuesto 10



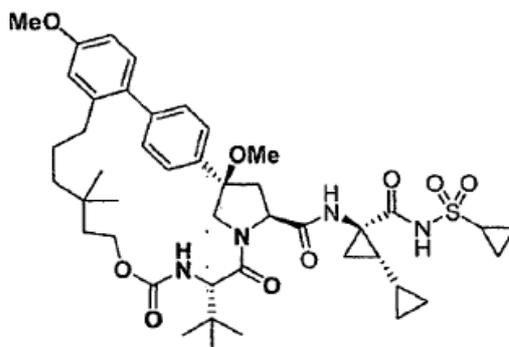
Compuesto 10

25 El compuesto 10 se preparó usando procedimientos análogos a la preparación del compuesto 4. CLEM: Tr= 1,99 min. [M+Na]⁺ = 829; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - ,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220, RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,71 (sa, 3H) 0,79 - 0,91 (m, 3H) 0,92 - 1,00 (m, 2H) 1,09 (s, 9 H) 1,21 (d, J = 8,24 Hz, 1H) 1,31 - 1,39 (m, 3H) 1,42 (sa, 2H) 1,93 (t, J = 6,87 Hz, 1H) 2,07 (c, J = 8,55 Hz, 1H) 2,34 - 2,44 (m, 1H)

30

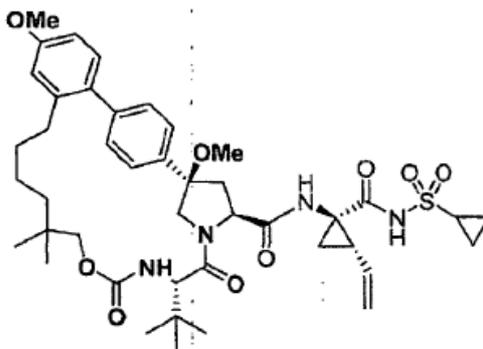
2,50 (sa, 1H) 2,54 - 2,66 (m, 1H) 2,67 - 2,77 (m, 1H) 2,85 - 2,99 (m, 1H) 3,10 (s, 2H) 3,16 (s, 2H) 3,18 - 3,27 (m, 1H) 3,64 (d, J = 10,68 Hz, 1H) 3,85 (s, 3H) 3,92 - 4,01 (m, 1H) 4,04 - 4,14 (m, 1H) 4,17 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 4,25 - 4,34 (m, 1H) 4,45 - 4,58 (m, 1H) 4,87 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 5,08 - 5,21 (m, 1H) 5,21 - 5,34 (m, 1H) 5,54 (d, J = 8,85 Hz, 1H) 5,64 - 5,83 (m, 1H) 6,75 - 6,90 (m, 2H) 7,18 (dd, J = 18,31, 8,55 Hz, 1H) 7,28 - 7,33 (m, 2H) 7,36 - 7,46 (m, 2H) 9,92 (sa, 1H).

5

Compuesto 11**Compuesto 11**

El compuesto 11 se preparó usando procedimientos análogos a la preparación del compuesto 3. CLEM: Tr= 2,02 min. $[M+Na]^+$ = 843; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,30 (sa, 2H) 0,50 - 0,62 (m, 2H) 0,69 (sa, 3H) 0,81 (d, J = 9,16 Hz, 6 H) 0,91 - 1,01 (m, 3H) 1,05 (s, 9 H) 1,09 - 1,22 (m, 2H) 1,10 - 1,15 (m, 1H) 1,32 - 1,40 (m, 2H) 1,41 - 1,48 (m, 1H) 1,77 (sa, 1H) 2,42 - 2,62 (m, 4 H) 3,03 (s, 2H) 3,11 (s, 1H) 3,84 (s, 3H) 3,85 - 3,93 (m, 2H) 4,04 - 4,21 (m, 2H) 4,38 - 4,51 (m, 1H) 6,67 - 6,86 (m, 2H) 7,06 - 7,21 (m, 1H) 7,25 - 7,31 (m, 5 H) 7,39 (sa, 2H) 9,91 (sa, 1H)

15

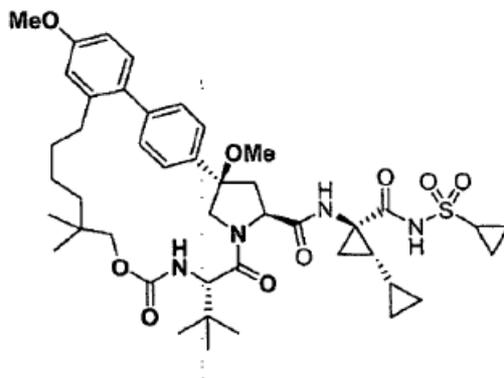
Compuesto 12:**Compuesto 12**

El compuesto 12 se preparó usando procedimientos análogos a la preparación del compuesto 7. CLEM: Tr= 1,98 min. $[M+Na]^+$ = 829; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,77 (s, 3H) 0,88 (s, 3H) 1,00 - 1,01 (m, 2H) 1,04 (s, 9 H) 1,16 - 1,24 (m, 2H) 1,16 - 1,23 (m, 2H) 1,33 - 1,40 (m, 2H) 1,52 (dd, J = 9,46, 5,80 Hz, 1H) 1,88 - 2,05 (m, 1H) 2,05 - 2,23 (m, 1H) 2,32 - 2,43 (m, 1H) 2,53 - 2,63 (m, 1H) 2,64 - 2,76 (m, 1H) 2,79 (dd, J = 12,82, 7,02 Hz, 1H) 2,89 - 3,00 (m, 1H) 3,11 (s, 3H) 3,15 (s, 1H) 3,20 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 3,58 - 3,73 (m, 1H) 3,86 (s, 3H) 4,00 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 4,29 - 4,39 (m, 2H) 4,42 (d, J = 10,07 Hz, 1H) 5,15 - 5,24 (m, 1H) 5,27 - 5,38 (m, 1H) 5,58 - 5,69 (m, 1H) 5,75 - 5,86 (m, 1H) 6,76 - 6,86 (m, 1H) 6,81 (s, 1H) 6,99 (sa, 1H) 7,16 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 7,30 (s, 1H) 7,32 (s, 1H) 7,38 (d, J = 8,24 Hz, 2H) 7,41 - 7,45 (m, 1H) 9,85 (sa, 1H).

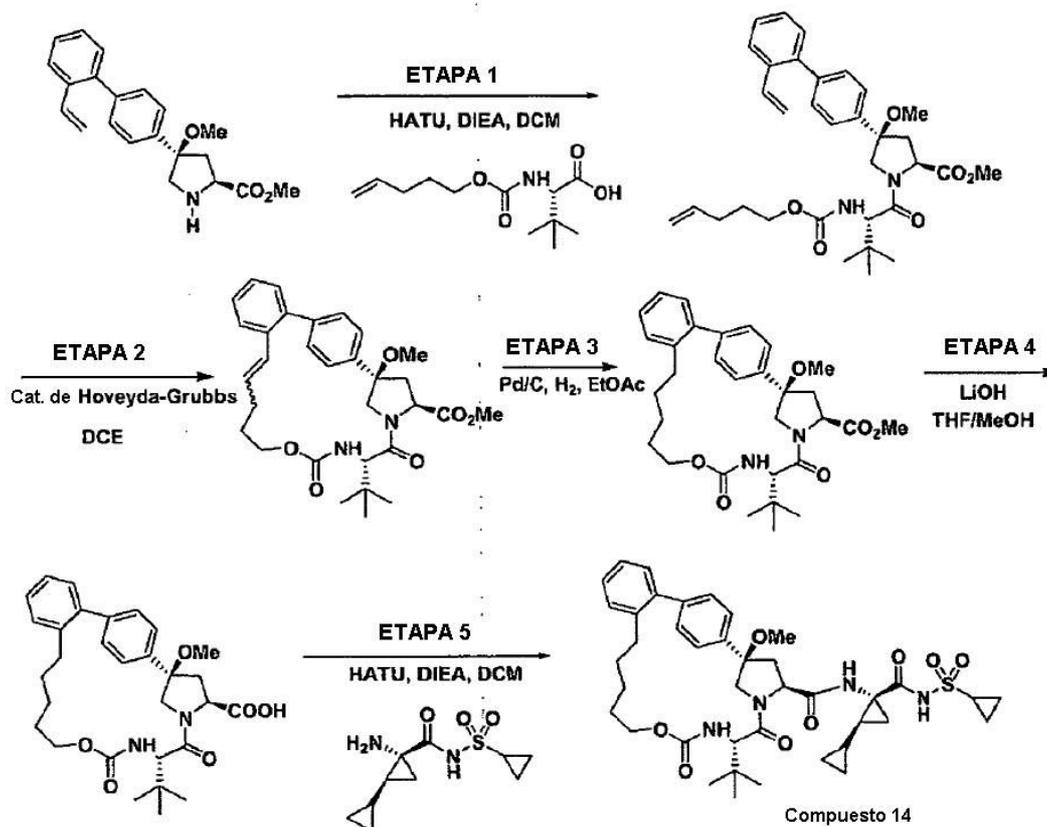
20

25

30

Preparación del Compuesto 13:**Compuesto 13**

El compuesto 13 se preparó usando procedimientos análogos a la preparación del compuesto 5. CLEM: Tr= 2,02 min. $[M+Na]^+ = 843$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min, y, después, retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220, RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,24 - 0,45 (m, 2H) 0,51 - 0,65 (m, 2H) 0,78 (s, 3H) 0,78 - 0,82 (m, 2H) 0,88 (s, 3H) 0,96 - 1,02 (m, 2H) 1,01 - 1,05 (m, 9 H) 1,08 - 1,21 (m, 2H) 1,27 (dd, J = 9,46, 5,80 Hz, 1H) 1,34 - 1,45 (m, 2H) 1,84 (dd, J = 7,93, 6,10 Hz, 1H) 2,32 - 2,55 (m, 1H) 2,56 - 2,68 (m, 1H) 2,68 - 2,80 (m, 1H) 2,92 - 3,05 (m, 1H) 3,10 (s, 3H) 3,21 (d, J = 10,3 Hz, 1H) 3,86 (s, 3H) 3,94 - 4,17 (m, 1H) 4,22 - 4,37 (m, 2H) 4,41 (d, J = 10,07 Hz, 1H) 4,78 - 5,41 (m, 2H) 5,34 (sa, 1H) 6,76 - 6,86 (m, 3H) 7,16 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 7,21 - 7,27 (m, 2H) 7,28 - 7,44 (m, 5 H) 9,77 (sa, 1H).

Preparación del Compuesto 14:

15

Etapa 1:

A una solución de 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (200 mg, 0,593 mmol), ácido (S)-3,3-dimetil-2-((pent-4-eniloxi)carbonilamino)-butanoico (180 mg, 0,741 mmol) y DIEA (0,311 ml, 1,778 mmol) en DCM (8 ml) se añadió HATU (248 mg, 0,652 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. La reacción se evaporó y se purificó en Biotage (10-40 % de EtOAc : hexanos) para dar el producto 1-((S)-2-3,3-dimetil-2-((pent-4-eniloxi)carbonilamino)butanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (251 mg, 0,446 mmol, rendimiento del 75 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,96 - 1,00 (m, 1H) 1,04 - 1,10 (m, 1H) 1,11 - 1,21 (m, 7 H) 1,64 - 1,79 (m, 2H) 2,06 - 2,20 (m, 2H) 2,52 (dd, J = 13,30, 8,78 Hz, 1H) 2,83 - 3,04 (m, 4 H) 3,72 - 3,82 (m, 3H) 3,96 - 4,12 (m, 3H) 4,15 - 4,21 (m, 1H) 4,31 - 4,41 (m, 1H) 4,86 - 5,10 (m, 3H) 5,19 - 5,30 (m, 1H) 5,41 (d, J = 9,79 Hz, 1H) 5,67 - 5,87 (m, 2H) 6,61 - 6,76 (m, 1H) 7,28 - 7,44 (m, 7 H) 7,61 - 7,71 (m, 1H). CLEM: Tr= 2,18 min. [M+H⁺ = 563; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

Una solución de 1-((S)-3,3-dimetil-2-((pent-4-eniloxi)carbonilamino)butanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (251 mg, 0,446 mmol) en DCE (100 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y después se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (2^a generación) (28 mg, 0,045 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 100 °C durante 18 horas. La reacción se concentró para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 - 40 % de EtOAc en hexanos), dando el producto (196 mg, 0,367 mmol, rendimiento del 82 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 1,07 (s, 9 H) 1,63 (dd, J = 12,17, 8,66 Hz, 1H) 1,88 - 2,02 (m, 1H) 2,20 - 2,30 (m, 2H) 2,33 (dd, J = 12,42, 10,92 Hz, 1H) 3,05 (s, 3H) 3,07 - 3,16 (m, 1H) 3,72 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 3,76 - 3,81 (m, 3H) 3,91 (dt, J = 10,35, 3,73 Hz, 1H) 4,20 - 4,30 (m, 1H) 4,37 (dd, J = 10,79, 8,03 Hz, 1H) 4,55 (d, J = 9,79 Hz, 1H) 4,87 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 5,34 (d, J = 9,79 Hz, 1H) 5,96 - 6,06 (m, 1H) 6,34 (d, J = 15,81 Hz, 1H) 7,29 - 7,36 (m, 3H) 7,39 - 7,46 (m, 2H) 7,48 - 7,58 (m, 3H). CLEM: Tr= 2,13 min. [M+H⁺ = 535; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

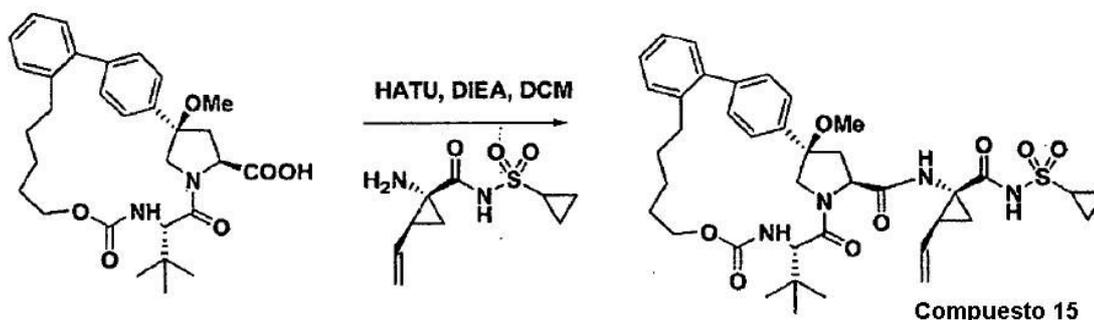
Una solución del producto de la etapa 2 (196 mg, 0,367 mmol) y 10 % de Pd/C (39 mg, 0,037 mmol) en EtOAc (10 ml) se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. La reacción se filtró a través de una frita de nylon y se concentró para dar el producto bruto (194 mg, 0,361 mmol, rendimiento del 99 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 2,08 min. [M+H⁺ = 537; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

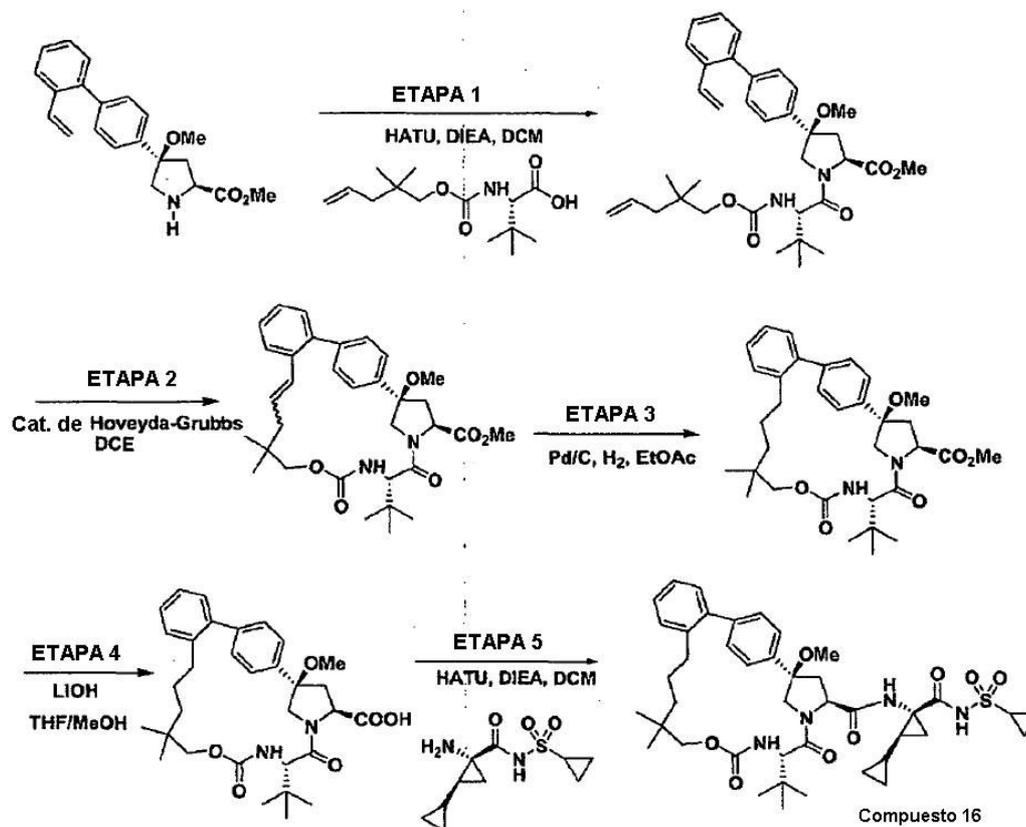
A una solución del producto de la etapa 3 (194 mg, 0,361 mmol) en THF (3,00 ml) y MeOH (3 ml) se añadió hidróxido de litio 2,0 M (0,90 ml, 1,80 mmol) y se agitó durante 3 horas. La reacción se diluyó con éter y HCl 1,0 M. La capa orgánica se secó, se filtró y se evaporó, para dar el producto bruto (180 mg, 0,344 mmol, rendimiento del 95 %). CLEM: Tr= 1,85 min. [M+H⁺ = 523; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

A una solución de (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (58 mg, 0,207 mmol), el producto de la etapa 4 (90 mg, 0,172 mmol) y base de Hunig (0,090 ml, 0,517 mmol) en diclorometano (5 ml) se añadió HATU (98 mg, 0,258 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)). Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 14 (40 mg, 0,053 mmol, rendimiento del 31 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,27 - 0,39 (m, 2H) 0,48 - 0,62 (m, 2H) 0,81 - 0,93 (m, 1H) 1,03 (s, 9 H) 1,06 - 1,21 (m, 6 H) 1,22 - 1,30 (m, 3H) 1,41 (sa, 2H) 1,51 (sa, 2H) 1,76 (dd, J = 8,03, 5,52 Hz, 1H) 2,28 - 2,38 (m, 1H) 2,43 - 2,55 (m, 2H) 2,93 - 3,02 (m, 2H) 3,05 (s, 3H) 3,59 (sa, 1H) 3,91 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,26 - 4,41 (m, 3H) 4,45 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 7,15 - 7,25 (m, 2H) 7,28 (d, J = 3,51 Hz, 2H) 7,34 (m, J = 8,03 Hz, 2H) 7,56 (m, J = 8,03 Hz, 2H). CLEM: Tr= 1,99 min. [M+H⁺ = 749; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Preparación del Compuesto 15:

A una solución de (1R, 2S)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de TsOH (83 mg, 0,207 mmol), el producto de la etapa 4 de la preparación del compuesto 14 (90 mg, 0,172 mmol) y base de Hunig (0,090 ml, 0,517 mmol) en diclorometano (5 ml) se añadió HATU (98 mg, 0,258 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)). Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 15 (676 mg, 0,090 mmol, rendimiento del 52 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,99 -1,11 (m, 11H) 1,11 - 1,27 (m, 4 H) 1,30 - 1,55 (m, 5 H) 1,88 (dd, J = 8,03, 5,52 Hz, 1H) 2,16 - 2,27 (m, 1 H) 2,37 (dd, J = 12,42, 9,41 Hz, 1H) 2,43 - 2,58 (m, 2H) 2,88 - 3,05 (m, 2H) 3,07 (s, 3H) 3,59 (t, J = 10,54 Hz, 1H) 3,93 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,30 - 4,39 (m, 2 H) 4,43 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 5,12 (dd, J = 10,29, 1,76 Hz, 1H) 5,29 (dd, J = 17,19, 1,38 Hz, 1H) 5,78 (ddd, J = 17,19, 10,29, 8,91 Hz, 1H) 7,16 - 7,26 (m, 2H) 7,28 (d, J = 3,26 Hz, 2H) 7,35 (d, J = 8,03 Hz, 2H) 7,58 (d, J = 8,03 Hz, 2H). CLEM: Tr= 1,97 min. [M+H⁺ = 735; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Preparación del Compuesto 16:

Etapa 1:

A una solución de 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (200 mg, 0,593 mmol), ácido (S)-2-(2,2-dimetil-pent-4-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (201 mg, 0,741 mmol) y DIEA (0,311 ml, 1,778 mmol) en DCM (8 ml) se añadió HATU (248 mg, 0,652 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. La reacción se evaporó y purificó en Biotage (10 - 40 % EtOAc:Hex) para dar 1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il) pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (235 mg, 0,398 mmol, rendimiento del 67 %) como un sólido blanco. RMN de ^1H (400 MHz, CLOROFORMO - d δ ppm 0,83 - 0,94 (m, 6 H) 0,97 - 1,02 (m, 1H) 1,06 - 1,10 (m, 1H) 1,12 - 1,19 (m, 7H) 1,95 - 2,07 (m, 2H) 2,46 - 2,59 (m, 1 H) 2,88 (d, J = 12,80 Hz, 1H) 2,92 - 3,03 (m, 3H) 3,65 - 3,74 (m, 1H) 3,74 - 3,79 (m, 3H) 3,79 - 3,86 (m, 1H) 4,00 - 4,09 (m, 1H) 4,14 - 4,21 (m, 1H) 4,31 - 4,42 (m, 1H) 4,85 - 4,92 (m, 1H) 4,95 - 5,09 (m, 2H) 5,17 - 5,26 (m, 1H) 5,38 - 5,49 (m, 1 H) 5,67 - 5,84 (m, 2H) 6,60 - 6,75 (m, 1H) 7,25 - 7,30 (m, 1H) 7,30 - 7,42 (m, 6 H) 7,61 - 7,68 (m, 1H). CLEM: Tr= 2,25 min. $[\text{M}+\text{H}^+ = 591$; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 μl ; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

Una solución de 1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (235 mg, 0,398 mmol) en DCE (100 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y después se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (2^a generación) (25 mg, 0,040 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 100 °C durante 18 horas. La reacción se concentró para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 - 40 % de EtOAc en hexanos), dando el producto (177 mg, 0,315 mmol, rendimiento del 79 %) como un sólido blanco. RMN de ^1H (400 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,95 - 1,01 (m, 3H) 1,02 - 1,05 (m, 3H) 1,05 - 1,10 (m, 9 H) 1,82 - 1,92 (m, 1H) 2,26 - 2,44 (m, 2H) 3,03 - 3,07 (m, 3H) 3,14 (ddd, J = 12,61, 8,09, 1,63 Hz, 1H) 3,45 (dd, J = 10,04, 1,25 Hz, 1H) 3,68 - 3,74 (m, 1H) 3,76 - 3,81 (m, 3H) 4,01 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 4,39 (dd, J = 10,79, 8,03 Hz, 1H) 4,52 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 4,85 (dd, J = 10,79, 1,51 Hz, 1H) 5,33 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 6,16 (ddd, J = 15,56, 10,79, 4,77 Hz, 1H) 6,29 - 6,39 (m, 1H) 7,29 - 7,36 (m, 3H) 7,37 - 7,45 (m, 2H) 7,47 - 7,53 (m, 2H) 7,54 - 7,60 (m, 1H). CLEM: Tr= 2,20 min. $[\text{M}+\text{H}^+ = 563$; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 μl ; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

Una solución del producto de la etapa 2 (177 mg, 0,315 mmol) y 10 % de Pd/C (33 mg, 0,031 mmol) en EtOAc (10 ml) se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. La reacción se filtró a través de una frita de nylon y se concentró para dar el producto bruto (176 mg, 0,312 mmol, rendimiento del 99 %) como un sólido blanco. RMN de ^1H (400 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,79 ((s, 3H) 0,92 - 0,95 (m, 3H) 1,02 - 1,11 (m, 9 H) 1,22 1,35 (m, 1H) 1,38 - 1,49 (m, 2H) 2,26 2,41 (m, 2H) 2,48 - 2,58 (m, 1H) 3,06 (s, 3H) 3,07 - 3,12 (m, 1H) 3,15 (d, J = 10,79 Hz, 1H) 3,76 - 3,81 (m, 4 H) 4,36 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,44 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 4,48 (dd, J = 10,54, 8,03 Hz, 1H) 4,62 - 4,69 (m, 1H) 5,30 (d, J = 9,79 Hz, 1H) 7,22 (d, J = 2,01 Hz, 1H) 7,24 (d, J = 2,5 Hz, 1H) 7,28 - 7,32 (m, 2H) 7,32 - 7,37 (m, 3H) 7,47 (d, J = 8,28 Hz, 2H). CLEM: Tr= 2,13 min. $[\text{M}+\text{H}^+ = 565$; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 μl ; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

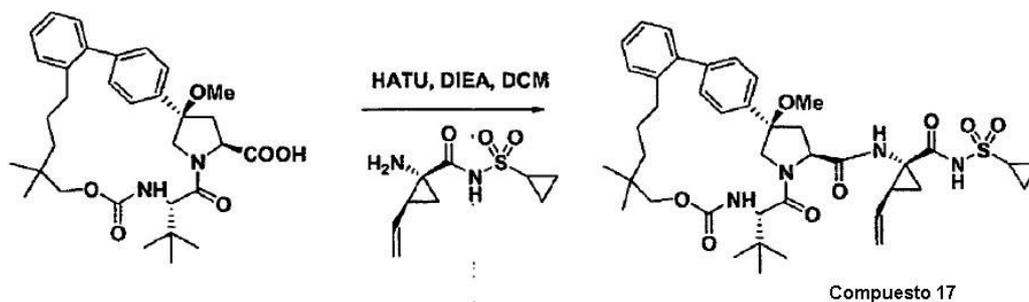
A una solución del producto de la etapa 3 (176 mg, 0,312 mmol) en THF (2.000 ml) y MeOH (2 ml) se añadió hidróxido de litio 2,0 M (0,78 ml, 1,56 mmol) y se agitó durante 3 horas. La reacción se diluyó con éter y HCl 1,0 M. La capa orgánica se secó, se filtró y se evaporó, para dar el producto bruto (160 mg, 0,291 mmol, rendimiento del 93 %). CLEM: Tr= 1,92 min. $[\text{M}+\text{H}^+ = 551$; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 μl ; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

A una solución de (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (49 mg, 0,174 mmol), el producto de la etapa 4 (80 mg, 0,145 mmol) y base de Hunig (0,076 ml, 0,436 mmol) en diclorometano (4 ml) se añadió HATU (83 mg, 0,218 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)). Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 16 (35 mg, 0,044 mmol, rendimiento del 30 %) como un sólido blanco. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,33 - 0,44 (m, 2H) 0,54 - 0,72 (m, 2H) 0,86 (s, 3H) 0,88 - 0,95 (m, 1H) 1,04 (s, 3H) 1,10 (s, 9H) 1,12 -

- 1,23 (m, 4H) 1,24 - 1,39 (m, 4 H) 1,41 - 1,54 (m, 2H) 1,85 (dd, J = 8,03, 5,52 Hz, 1H) 2,30 (t, J = 11,80 Hz, 1H) 2,35 - 2,46 (m, 1H) 2,47 - 2,59 (m, 1H) 3,01 - 3,10 (m, 2H) 3,13 (s, 3H) 3,24 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 3,89 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,25 (dd, J = 10,79, 7,28 Hz, 1H); 4,37 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,53 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 4,80 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 6,90 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 7,20 - 7,31 (m, 2H) 7,31 - 7,38 (m, 2H) 7,41 (d, J = 8,28 Hz, 2H) 7,60 - 7,68 (m, 2H).
- 5 CLEM: Tr= 4,05 min. [M-OMe]⁺ = 745; Phenomenex-Luna C18, 50 x 2, 3u; Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 4 min y después retener durante 1 min.; 0,8 ml/min; vol. de iny. = 3 µl; longitud de onda = 220.

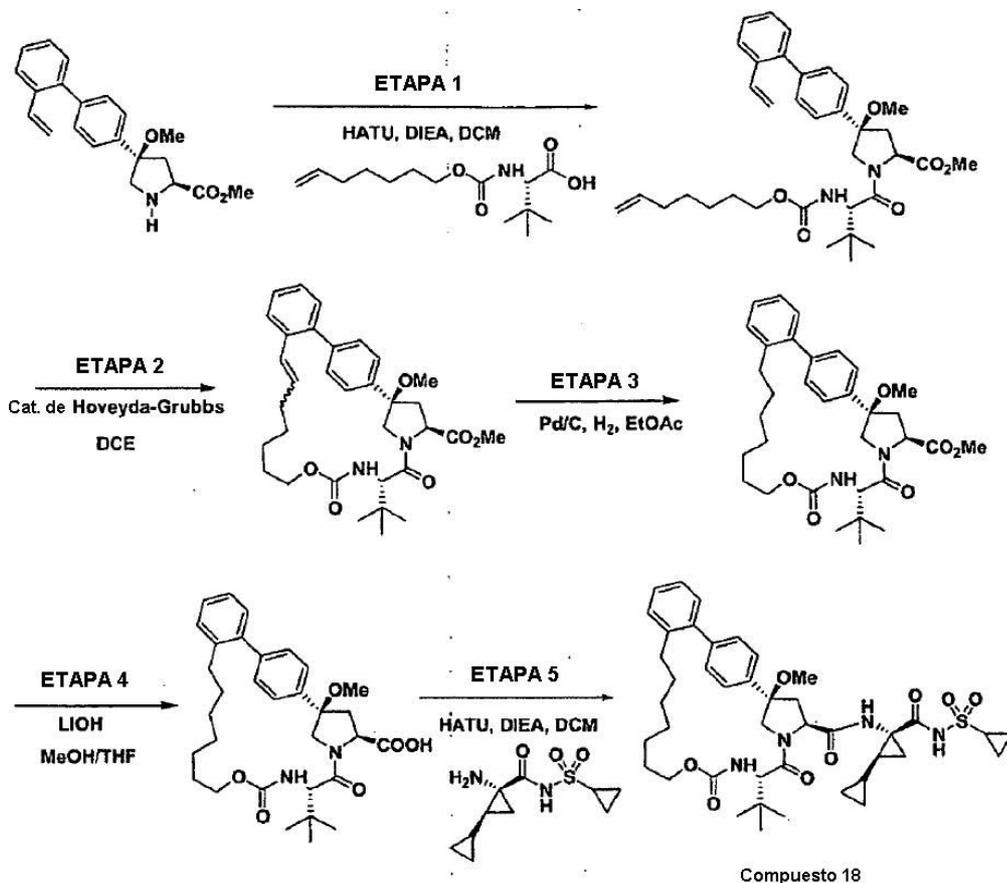
Preparación del Compuesto 17:



- 10 A una solución de (1R, 2S)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de TsOH (69,8 mg, 0,174 mmol), el producto de la etapa 4 de la preparación del compuesto 16 (80 mg, 0,145 mmol) y base de Hunig (0,076 ml, 0,436 mmol) en diclorometano (4 ml) se añadió HATU (83 mg, 0,218 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)).
- 15 Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 17 (52 mg, 0,064 mmol, rendimiento del 44 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,85 (s, 3H) 0,99 - 1,06 (m, 4 H) 1,06 - 1,17 (m, 12 H) 1,22 - 1,35 (m, 3H) 1,40 - 1,55 (m, 3H) 1,93 (dd, J = 8,03, 5,27 Hz, 1H) 2,20 - 2,30 (m, 1H) 2,31 - 2,45 (m, 2H) 2,49 - 2,61 (m, 1H) 2,93 - 3,02 (m, 1H) 3,08 - 3,16 (m, 4 H) 3,23 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 3,87 - 3,99 (m, 1H) 4,29 (dd, J = 10,92, 7,40 Hz, 1H) 4,34 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,48 - 4,55 (m, 1H) 4,77 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 5,16 (dd, J = 10,42, 1,63 Hz, 1H) 5,33 (dd, J = 17,07, 1,25 Hz, 1H) 5,85 (ddd, J = 17,13, 10,23, 9,03 Hz, 1H) 7,21 - 7,30 (m, 2H) 7,31 - 7,36 (m, 2H) 7,37 - 7,44 (m, 2H) 7,63 (d, J = 8,28 Hz, 2H). CLEM: Tr= 4,23 min. [M-OMe]⁺ = 731; Phenomenex-Luna C18, 50 x 2, 3u; Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 4 min y después retener durante 1 min.; 0,8 ml/min; vol. de iny. = 3 µl; longitud de onda = 220.

25

Preparación del Compuesto 18:



Etapa 1:

5 A una solución de 4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (200 mg, 0,593 mmol), ácido (S)-2-((hept-6-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (201 mg, 0,741 mmol) y DIEA (0,311 ml, 1,778 mmol) en DCM (8 ml) se añadió HATU (248 mg, 0,652 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. La reacción se evaporó y se purificó en Biotage (10-40 % de EtOAc : hexanos) para dar 1-((S)-2-((hept-6-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (260 mg, 0,440 mmol, rendimiento del 74 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,96 - 1,00 (m, 1H) 1,06 - 1,10 (m, 1H) 1,11 - 1,19 (m, 7 H) 1,30 - 1,47 (m, 4H) 1,55 - 1,64 (m, 2H) 1,99 - 2,10 (m, 2H) 2,49 - 2,55 (m, 1H) 2,89 (d, J = 13,05 Hz, 1H) 2,93 - 3,04 (m, 3H) 3,73 - 3,80 (m, 3H) 3,92 - 4,10 (m, 3H) 4,11 - 4,20 (m, 1 H) 4,31 - 4,41 (m, 1 H) 4,87 - 5,05 (m, 3H) 5,23 (dd, J = 10,92, 1,13 Hz, 1H) 5,38 - 5,42 (m, 1H) 5,68 - 5,75 (m, 1H) 5,75 - 5,86 (m, 1H) 6,62 - 6,76 (m, 1H) 7,28 - 7,43 (m, 7 H) 7,63 - 7,69 (m, 1H). CLEM: Tr= 2,25 min. [M+H⁺ = 591; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

20 Una solución de 1-((S)-2-((hept-6-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (260 mg, 0,440 mmol) en DCE (100 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y después se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (27 mg, 0,044 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 100 °C durante 18 horas. La reacción se concentró para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 - 40 % de EtOAc en hexanos), dando el producto (232 mg, 0,412 mmol, rendimiento del 94 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 1,08 - 1,15 (m, 9H) 1,32 - 1,41 (m, 2H) 1,42 - 1,59 (m, 3H) 1,69 (d, J = 2,76 Hz, 1H) 2,06 - 2,19 (m, J = 14,18, 9,60, 4,80, 4,80 Hz; 1H) 2,29 - 2,40 (m, 1H) 2,50 (t, J = 11,42 Hz, 1H) 2,68 (dd, J = 11,92, 7,40 Hz, 1H) 3,08 (s, 3H) 3,75 (s, 3H) 3,77 - 3,84 (m, 2H) 4,25 (dd, J = 10,29, 7,53 Hz, 1H) 4,52 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 4,59 (td, J = 10,54, 4,02 Hz, 1H) 4,83 (d, J = 10,29 Hz, 1H) 5,35 (d, J = 10,04 Hz, 1H) 5,98 - 6,12 (m, 1H) 6,39 (d, J = 15,56 Hz, 1H) 7,28 - 7,33 (m, 3H) 7,40 - 7,46 (m, 2H) 7,46 - 7,52 (m, 2H) 7,56 (d, J = 7,03 Hz, 1 H). CLEM: Tr= 2,20 min. [M+H⁺ = 563; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener

30

durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

Una solución del producto de la etapa 2 (232 mg, 0,412 mmol) y 10 % de Pd/C (44 mg, 0,041 mmol) en EtOAc (10 ml) se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. La reacción se filtró a través de una frita de nylon y se concentró para dar el producto (207 mg, 0,367 mmol, rendimiento del 89 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr= 2,18 min. [M+H⁺ = 565; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

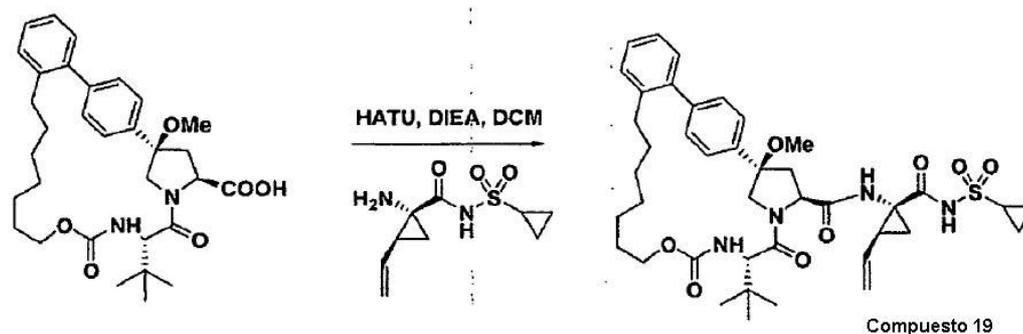
Etapa 4:

A una solución del producto de la etapa 3 (208 mg, 0,368 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) se añadió hidróxido de litio 2,0 M (0,92 ml, 1,84 mmol) y se agitó durante 3 horas. La reacción se diluyó con éter y HCl 1,0 M. La capa orgánica se secó, se filtró y se evaporó, para dar el producto bruto (200 mg, 0,363 mmol, rendimiento del 99 %). CLEM: Tr= 2,01 min. [M+H⁺ = 551; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

A una solución de (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (61 mg, 0,218 mmol), el producto de la etapa 4 (100 mg, 0,182 mmol) y base de Hunig (0,095 ml, 0,545 mmol) en diclorometano (4 ml) se añadió HATU (104 mg, 0,272 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 64 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)). Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 18 (71 mg, 0,085 mmol, rendimiento del 46,8 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,32 - 0,43 (m, 2H) 0,53 - 0,68 (m, 2H) 0,85 - 0,95 (m, 1H) 1,10 - 1,24 (m, 13 H) 1,24 - 1,41 (m, 8 H) 1,49 - 1,72 (m, 4 H) 1,80 (dd, J = 8,03, 5,27 Hz, 1H) 2,49 - 2,68 (m, 4 H) 3,01 - 3,09 (m, 1H) 3,13 (s, 3H) 3,72 - 3,84 (m, 1H) 4,04 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,17 (t, J = 8,16 Hz, 1H) 4,47 - 4,59 (m, 2H) 4,66 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 7,21 - 7,31 (m, 2H) 7,35 (d, J = 3,76 Hz, 2H) 7,40 - 7,46 (m, 2H) 7,64 (d, J = 7,78 Hz, 2H). CLEM: Tr= 2,13 min. [M-OMe]⁺ = 745; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

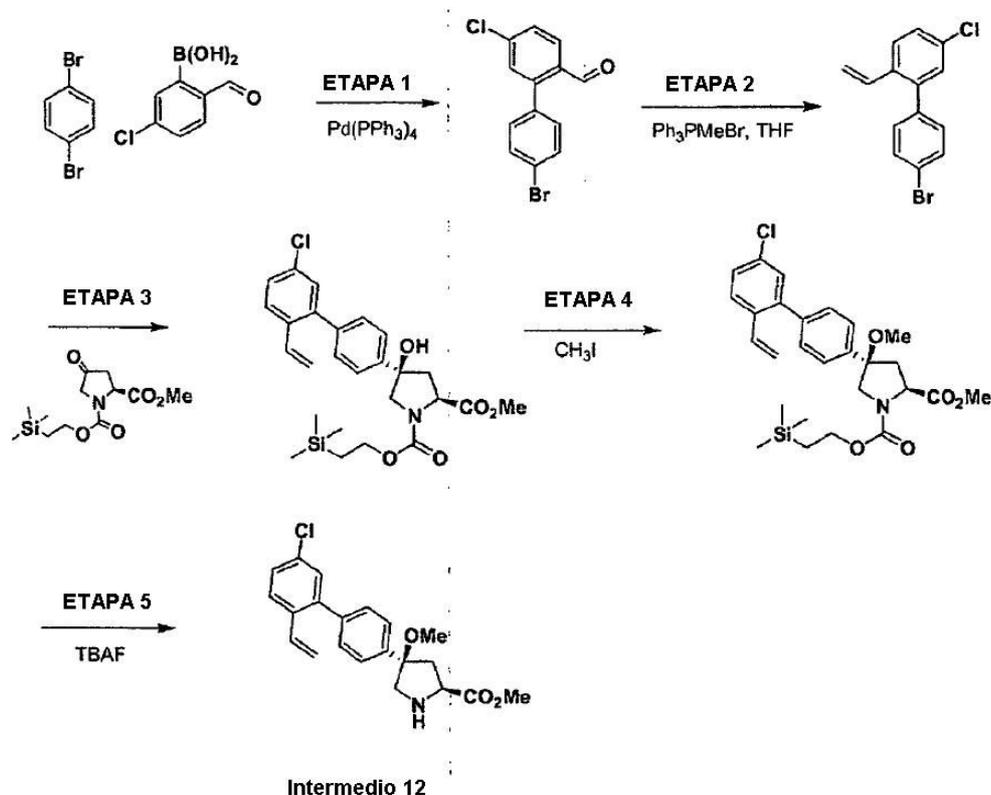
Preparación del Compuesto 19:



A una solución de (1R, 2S)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)2-vinilciclopropanocarboxamida, sal de TsOH (87 mg, 0,218 mmol), el producto de la etapa 4 de la preparación del compuesto 18 (100 mg, 0,182 mmol) y base de Hunig (0,095 ml, 0,545 mmol) en diclorometano (4 ml) se añadió HATU (104 mg, 0,272 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró y se purificó mediante HPLC (Xbridge C18 10u (30 x100 mm); caudal= 42 ml/min; gradiente del disolvente = 5:5 a 5:95 de agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10mM)). Las fracciones del producto se concentraron para dar el compuesto 19 (67 mg, 0,083 mmol, rendimiento del 46 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ ppm 1,06 - 1,15 (m, 2H) 1,18 (s, 9 H) 1,29 (sa, 4 H) 1,30 (d, J = 4,52 Hz, 4 H) 1,45 - 1,70 (m, 5 H) 1,86 - 1,98 (m, 1H) 2,18 - 2,29 (m, 1H) 2,49 - 2,72 (m, 4 H) 2,94 - 3,06 (m, 1H) 3,14 (s, 3H) 3,71 - 3,85 (m, 1H) 4,06 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 4,21 (t, J = 8,03 Hz, 1H) 4,47 - 4,59 (m, 2H) 4,64 (d, J = 10,54 Hz, 1H) 5,13 - 5,22 (m, 1H) 5,27 - 5,40 (m, 1H) 5,82 (ddd, J = 17,19, 10,29, 8,91 Hz, 1H) 7,21 - 7,32 (m, 2H) 7,35 (d, J = 3,51 Hz, 2H) 7,43 (d, J = 8,28 Hz, 2H) 7,65 (d, J = 8,03 Hz, 2H). CLEM: Tr= 2,08 min. [M-OMe]⁺ = 731; Phenomenex-Luna S10 (3 x 50 mm); Disolvente A = 95 % de agua-5 % de metanol-acetato amónico 10mM, Disolvente B = 5 % de agua -95 % de metanol - acetato amónico 10mM; gradiente 0 % a 100 % de Disolvente B

durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 10 µl; longitud de onda = 220.

Preparación del intermedio 12:



Etapas 1:

- 5 En una solución de 1,4-dibromobenceno (8,3 g, 35,3 mmol), carbonato potásico (11,3 g, 81 mmol) y ácido 5-cloro-2-formilfenilborónico (5 g, 27,1 mmol) en DME (150 ml) y agua (30 ml) (en un vaso de presión) se roció nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió Pd(PPh₃)₄ (0,94 g, 0,814 mmol) y después la reacción se calentó hasta 80 °C durante la noche. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se evaporó en rotavap. El residuo se diluyó en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el material
- 10 bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (0 - 15 % de EtOAc/hexanos), dando 4'-bromo-5-clorobifenil-2-carbaldehído (4,17 g, 14,11 mmol, rendimiento del 52 %) en forma de un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, Cloroformo-D) δ ppm 7,18 - 7,28 (m, 2H) 7,42 (d, J = 2,01 Hz, 1H) 7,50 (ddd, J = 8,41, 2,01, 0,88 Hz, 1H) 7,59 - 7,69 (m, 2H) 7,98 (d, J = 8,53 Hz, 1H) 9,92 (s, 1H).

Etapas 2:

- 15 A una solución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (10,1 g, 28,2 mmol) en THF (65 ml) se añadió BuLi (2,5M en hexanos, 11,3 ml, 28,2 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. Gota a gota se añadió una solución de 4'-bromo-5-clorobifenil-2-carbaldehído (4,2 g, 14,11 mmol) en THF (65 ml) a 0 °C. La mezcla se agotó durante la noche de 0 °C hasta la temperatura ambiente. La reacción se filtró y se evaporó. El residuo se diluyó con éter dietílico y se lavó con agua y después con salmuera. La capa de éter se recogió, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, para dar
- 20 el material bruto. El material bruto se purificó en Biotage (5-15 % de EtOAc:Hex), dando 4'-bromo-5-cloro-2-vinilbifenil (3,43 g, 11,68 mmol, rendimiento del 83 %) como un aceite transparente. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 5,22 (dd, J = 10,99, 1,22 Hz, 1H) 5,67 (dd, J = 17,40, 1,22 Hz, 1H) 6,57 (dd, J = 17,40, 10,99 Hz, 1H) 7,16 - 7,21 (m, 2H) 7,24 (d, J = 2,14 Hz, 1H) 7,31 (dd, J = 8,39, 2,29 Hz, 1H) 7,50 - 7,58 (m, 3H).

Etapas 3:

- 25 En un matraz de fondo redondo se agitó magnesio (0,298 g, 12,27 mmol) en nitrógeno durante 15 minutos para producir raspado de la superficie de las virutas de magnesio. A las virutas de magnesio se añadieron 10 ml de THF y se agitaron durante 30 minutos adicionales. Gota a gota se añadió 4'-bromo-5-cloro-2-vinilbifenilo (3,43 g, 11,68 mmol) en THF (60 ml), gota a gota, a reflujo con agitación enérgica. A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metil (3,35 g, 11,67 mmol) en DCM (60 ml) a temperatura ambiente se
- 30 añadió la solución de Grignard y se agitó durante 1 hora y después se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado.

La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se evaporaron, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10-40 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (800 mg, 1,593 mmol, rendimiento del 14 %) como un aceite amarillo. RMN de ^1H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,04 (s, 9 H) 1,03 (dd, J = 9,46, 7,63 Hz, 2H) 2,30 - 2,48 (m, 1H) 2,63 - 2,79 (m, 1H) 3,77 - 3,80 (m, 1H) 3,82 - 3,86 (m, 3H) 3,95 - 4,05 (m, 1H) 4,16 - 4,26 (m, 2H) 4,51 - 4,67 (m, 1H) 5,20 (d, J = 11,90 Hz, 1H) 5,67 (d, J = 17,40 Hz, 1H) 6,61 (dd, J = 17,40, 10,99 Hz, 1H) 7,26 - 7,35 (m, 4 H) 7,49 - 7,58 (m, 3H).

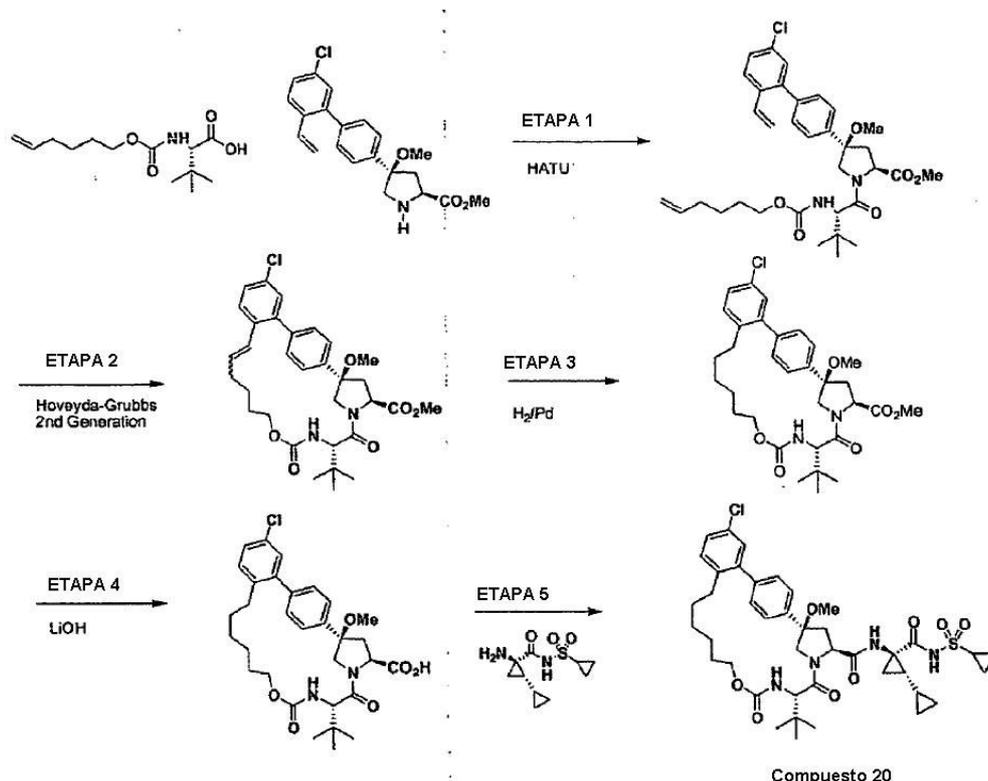
Etapa 4:

A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (740 mg, 1,474 mmol) y yoduro de metilo (0,166 ml, 2,65 mmol) a 0 °C en DMF se añadió NaOH (60 % en aceite) (106 mg, 2,65 mmol) a 0 °C en DMF y se agitó a esta temperatura y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. Después, la reacción se inactivó con una solución de NH_4Cl saturado y éter. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5 - 40 % EtOAc en hexanos) para dar el producto semipurificado 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (333 mg, 0,645 mmol, rendimiento del 44 %) como un aceite transparente. RMN de ^1H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,04 (s, 9 H) 1,01 - 1,06 (m, 2H) 2,52 (dd, J = 13,12, 8,85 Hz, 1H) 2,78 - 2,87 (m, 1H) 2,97 (d, J = 5,19 Hz, 3H) 3,65 (s, 1H) 3,67 - 3,75 (m, 3H) 3,77 (d, J = 8,85 Hz, 3H) 3,96 - 4,08 (m, 1H) 5,21 (d, J = 10,99 Hz, 1H) 5,68 (d, J = 17,40 Hz, 1H) 6,59 (ddd, J = 17,47, 11,06, 2,29 Hz, 1H) 7,26 (d, J = 2,14 Hz, 1H) 7,29 - 7,35 (m, 3H) 7,35 - 7,40 (m, 2H) 7,56 (d, J = 8,24 Hz, 1H).

Etapa 5:

A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (333 mg, 0,645 mmol) en THF (6 ml) se añadió TBAF (2,58 ml, 2,58 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó en rotovap para dar 4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (Intermedio 12, 215 mg, 0,578 mmol, rendimiento del 90 %) como un aceite amarillo. CLEM: Tr = 1,49 min. [M-MeOH] $^+$ = 340 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo - 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μl ; longitud de onda = 220.

Preparación del Compuesto 20:



Etapa 1:

A una solución de 4-metoxi-4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (215 mg, 0,578 mmol) en DCM (7 ml) se añadió ácido (S)-2-((but-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (186 mg, 0,723 mmol), DIEA (0,303 ml, 1,735 mmol) y HATU (242 mg, 0,636 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se evaporó y se purificó en Biotage (10-50 % de EtOAc en hexanos) para dar 4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-1-((S)-2-((hex5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (123 mg, 0,201 mmol, rendimiento del 35 %) como un aceite incoloro. CLEM: Tr= 2,58 min. $[M+H]^+$ = 612 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

4-(5'-cloro-2'-vinilbifenil-4-il)-1-((S)-2-((hex5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (123 mg, 0,201 mmol) se disolvió en DCE (25 ml) y se roció con nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (13 mg, 0,020 mmol) y se calentó en un baño de aceite a 80 °C durante 2 horas. La reacción se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 - 50 % de EtOAc/hexanos), dando el producto (95 mg, 0,163 mmol, rendimiento del 81 %) en forma de una espuma blanca. CLEM: Tr = 2,44 min. $[M+H]^+$ = 584 y $[M-MeOH]^+$ = 551; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

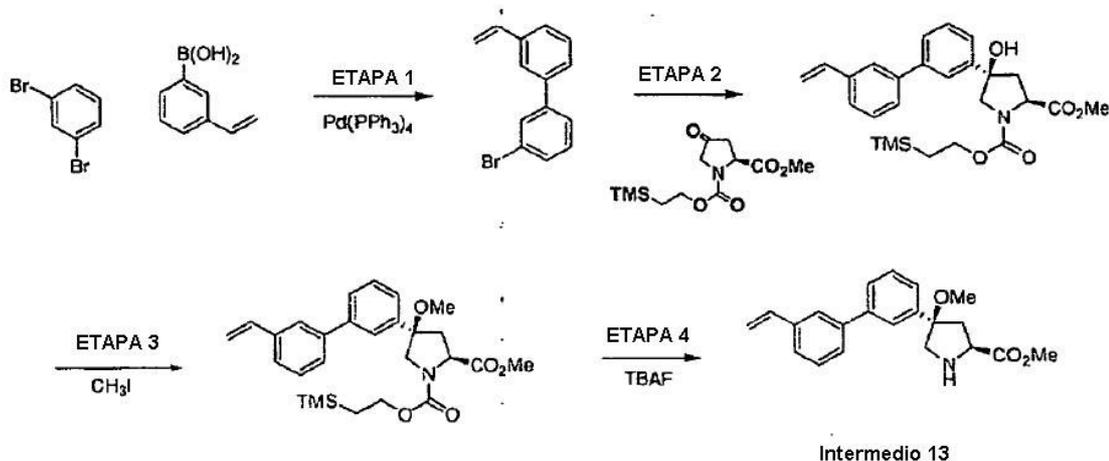
El producto de la etapa 2 (95 mg, 0,163 mmol) se disolvió en acetato de etilo (3 ml) y se trató con 10 % de paladio sobre carbono (17 mg, 0,016 mmol) y se agitó bajo un globo de hidrógeno durante la noche. La reacción se filtró mediante una frita de 0,45 μ m Millipore millex-HV y se evaporó para dar el producto (90 mg, 0,154 mmol, rendimiento del 94 %). CLEM: Tr= 2,40 min. $[M+H]^+$ = 586 y $[M-OMe]^+$ = 553; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = -0,1 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

Una solución de hidróxido de litio 2M (0,23 ml, 0,46 mmol) se añadió a una solución del producto de la etapa 3 (90 mg, 0,154 mmol) en THF (1 ml) y metanol (1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se diluyó después con 5 ml de HCl 1M y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el producto (74 mg, 0,130 mmol, rendimiento del 84 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr = 2,19 min. $[M+H]^+$ = 572 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

A una solución del producto de la etapa 4 (74 mg, 0,130 mmol) en DCM (2 ml) se añadió DIEA (0,068 ml, 0,389 mmol), HATU (54 mg, 0,143 mmol) y (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (44 mg, 0,155 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se evaporó y se purificó mediante HPLC prep. para dar el compuesto 20 (52 mg, 0,065 mmol, rendimiento del 50 %) como un sólido blancuzco. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,24 - 0,34 (m, 1H) 0,40 (sa, 1H) 0,56 (t, J = 6,41 Hz, 2H) 0,92 (d, J = 12,51 Hz, 2H) 1,01 (s, 9 H) 1,05 - 1,16 (m, 4 H) 1,16 - 1,21 (m, 1H) 1,30 - 1,40 (m, 2H) 1,39 - 1,49 (m, 1H) 1,73 - 1,81 (m, 1H) 2,47 (sa, 1H) 2,52 - 2,64 (m, 2H) 2,64 - 2,78 (m, 1H) 2,90 - 3,01 (m, 1H) 3,03 (s, 3H) 3,10 - 3,21 (m, 1H) 3,60 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 3,72 - 3,83 (m, 1H) 3,92 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 3,98 - 4,08 (m, 1H) 4,13 (d, J = 10,07 Hz, 1H) 4,37 (d, J = 9,77 Hz, 1H) 4,44 (t, J = 7,32 Hz, 1H) 4,47 - 4,56 (m, 1H) 4,86 (d, J = 8,85 Hz, 1H) 5,45 (sa, 1H) 5,76 (sa, 1H) 7,10 - 7,21 (m, 2H) 7,24 (s, 1H) 7,28 - 7,33 (m, 1H) 7,37 (d, J = 7,63 Hz, 1H) 7,41 (d, J = 5,19 Hz, 2H) 9,95 (sa, 1H). CLEM: Tr= 2,44 min. $[M-OMe]^+$ = 765; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Preparación del intermedio 13:**Eta 1:**

5 En una solución de 1,3-dibromobenceno (5,3 ml, 43,9 mmol), carbonato potásico (14,0 g, 101 mmol) y ácido 3-vinilfenilborónico (5 g, 33,8 mmol) en DME (100 ml) y agua (20 ml) (en un vaso de presión) se roció nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió Pd(PPh₃)₃ (1,17 g, 1,014 mmol) y después la reacción se calentó hasta 80 °C durante la noche. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se evaporó en rotovap. El residuo se diluyó en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (0-15 % de EtOAc:Hex), dando 3'-bromo-3-cloro-2-vinilbifenil (5,21 g, 20,10 mmol, rendimiento del 60 %) como un líquido transparente. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 5,33 (d, J = 10,79 Hz, 1H) 5,84 (dd, J = 17,57, 0,75 Hz, 1H) 6,80 (dd, J = 17,57, 10,79 Hz, 1H) 7,32 (t, J = 7,78 Hz, 1H) 7,38 - 7,48 (m, 3H) 7,51 (dddd, J = 13,24, 7,84, 1,76, 1,00 Hz, 2H) 7,56 - 7,61 (m, 1H) 7,76 (t, J = 1,88 Hz, 1H).

Eta 2:

15 En un matraz de fondo redondo se agitó magnesio ((0,513 g, 21,11 mmol) en nitrógeno durante 30 minutos para producir raspado de la superficie de las virutas de magnesio. A las virutas de magnesio se añadieron 10 ml de THF y se agitaron durante 30 minutos adicionales. Gota a gota se añadió 3-bromo-3'-vinilbifenilo (5,21 g, 20,10 mmol) en THF (100 ml), gota a gota, a reflujo con agitación enérgica. A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (5,78 g, 20,11 mmol) en DCM (110 ml) a 0° C se añadió la solución de Grignard y se agitó durante 1 hora y después se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se evaporaron, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5-40 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-1-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (2,9 g, 6,20 mmol, rendimiento del 31 %) como una espuma amarilla. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,05 (d, J = 2,44 Hz, 9 H) 0,99 (dd, J = 9,77, 7,32 Hz, 1H) 1,04 (dd, J = 9,61, 7,17 Hz, 1H) 1,27 (t, J = 7,17 Hz, 1H) 2,38 - 2,53 (m, 1H) 2,66 - 2,82 (m, 1H) 3,67 - 3,83 (m, 1H) 3,82 - 3,89 (m, 3H) 3,96 - 4,09 (m, 1H) 4,17 - 4,32 (m, 2H) 4,52 - 4,69 (m, 1H) 5,32 (d, J = 10,99 Hz, 1H) 5,83 (d, J = 17,40 Hz, 1H) 6,80 (dd, J = 17,55, 10,83 Hz, 1H) 7,39 - 7,46 (m, 2H) 7,46 - 7,52 (m, 3H) 7,55 (ddd, J = 4,58, 2,14, 1,83 Hz, 1H) 7,61 (sa, 1H) 7,73 (s, 1H). CLEM: Tr= 2,32 min. [M+H]⁺ = 468; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA; Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Eta 3:

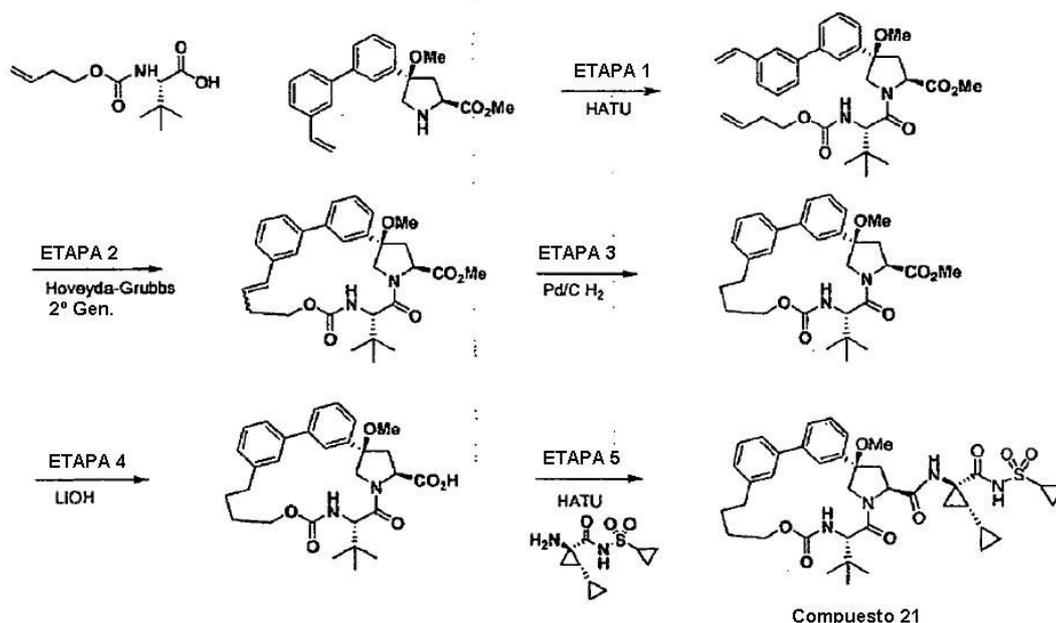
35 A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (2,9 g, 6,20 mmol) y yoduro de metilo (0,698 ml, 11,16 mmol) a 0 °C en DMF se añadió NaOH (60 % en aceite) (0,446 g, 11,16 mmol) y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después, la reacción se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado y éter. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5-45 % de EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (2,3 g, 4,78 mmol, rendimiento del 77 %) como un aceite transparente. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,04 - 0,11 (m, 9 H) 0,89 - 1,12 (m, 2H) 2,56 (dd, J = 13,18, 8,91 Hz, 1H) 2,86 (t, J = 12,67 Hz, 1H) 2,99 (d, J = 3,01 Hz, 3H) 3,66 - 3,92 (m, 1H) 3,79 (d, J = 7,0,3 Hz, 3H) 3,99 - 4,12 (m, 1H) 4,18 - 4,29 (m, 2H) 4,44 - 4,70 (m, 1H) 5,33 (d, J = 10,79 Hz, 1H) 5,84 (d, J = 16,82 Hz, 1H) 6,80 (dd, J = 17,57, 11,04 Hz, 1H) 7,34 (d, J = 7,53 Hz, 1H) 7,39 - 7,52 (m, 4 H) 7,53 - 7,59 (m, 3H). CLEM: Tr= 2,49 min. [M+H]⁺ = 482; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 %

de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

5 A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (2,3 g, 4,78 mmol) en THF (30 ml) se añadió TBAF (1,0 M en THF, 19 ml, 19 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar 4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (1,75 g, 5,19 mmol, rendimiento del 100 %) como un aceite amarillo. CLEM: Tr = 1,42 min. [M-OMe]⁺ = 306 min; Phenomenex-Luna C18 (5m) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo 10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 %
10 Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Preparación del Compuesto 21:



Etapa 1:

15 A una solución de 4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (250 mg, 0,741 mmol) en DCM (3 ml) se añadió ácido (S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (255 mg, 1.111 mmol), DIEA (0,40 ml, 2,223 mmol) y HATU (310 mg, 0,815 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se evaporó y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10-40 % de EtOAc : hexanos) para dar 1-((S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (277 mg, 0,505 mmol, rendimiento del 68 %) como una espuma blanca. CLEM: Tr= 2,31 min. [M+H]⁺ = 549; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 %
20 Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

25 1-((S)-2-((but-3-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxi-4-(3'-vinilbifenil-3-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (277 mg, 0,505 mmol) se disolvió en DCE (75 ml) y roció con nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (32 mg, 0,050 mmol) y se calentó en un baño de aceite a 80 °C durante 2 horas. La reacción se enfrió, se evaporó y se purificó en Biotage (5-50 % EtOAc/Hex) para dar el producto final (140 mg, 0,269 mmol, rendimiento del 53 %) como una espuma blanca. CLEM: Tr = 2,17 min. [M+H]⁺ = 521 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 %
30 Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

35 El producto de la etapa 2 (140 mg, 0,269 mmol) en acetato de etilo (3 ml) se trató con 10 % de paladio sobre carbono (29 mg, 0,027 mmol) y se agitó bajo un globo de hidrógeno durante la noche. La reacción se filtró mediante una frita de 0,45 μm Millipore millex-HV y se evaporó para dar el producto (139 mg, 0,266 mmol, rendimiento del 99

%). CLEM: Tr= 2,22 min. $[M+H]^+ = 523$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

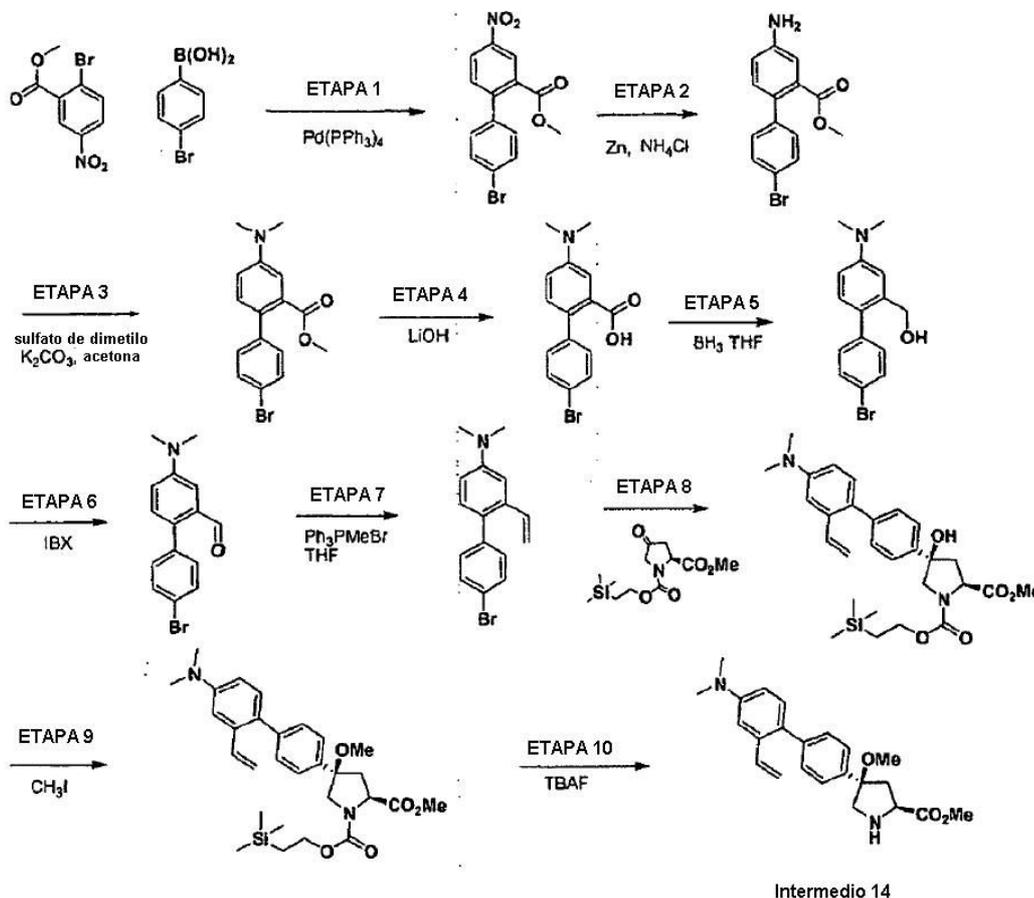
5 Etapa 4:

Una solución de hidróxido de litio 2M (0,40 ml, 0,80 mmol) se añadió a una solución del producto de la etapa 3 (139 mg, 0,266 mmol) en THF (1,5 ml) y metanol (1,5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se diluyó después con 5 ml de HCl 1M y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, después con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó, para dar el producto (130 mg, 0,256 mmol, rendimiento del 96 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr = 1,98 min. $[M+H]^+ = 509$ min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

15 A una solución del producto de la etapa 4 (130 mg, 0,256 mmol) en DCM (2,5 ml) se añadió DIEA (0,134 ml, 0,767 mmol), HATU (107 mg, 0,281 mmol) y (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (86 mg, 0,307 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción evaporó y se purificó mediante HPLC prep. para dar el compuesto 21 (63 mg, 0,084 mmol, rendimiento del 33 %) como un sólido blancuzco. RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,13 - 0,26 (m, 2H) 0,43 - 0,57 (m, 2H) 0,79 - 0,89 (m, 2H) 0,94 - 1,01 (m, 2H) 1,04 (s, 9 H) 1,20 (dd, J = 9,77, 5,49 Hz, 1H) 1,23 - 1,28 (m, 1H) 1,29 - 1,37 (m, 1H) 1,53 - 1,73 (m, 2H) 1,73 - 1,84 (m, 2H) 2,30 (dd, J = 12,36, 6,87 Hz, 1H) 2,51 - 2,69 (m, 2H) 2,71 - 2,81 (m, 1H) 2,82 - 2:95 (m, 1H) 3,16 (s, 3H) 3,78 (td, J = 7,40, 3,81 Hz, 1H) 3,97 (dd, J = 9,31, 6,87 Hz, 1H) 4,02 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 4,50 (d, J = 9,77 Hz, 1H) 4,62 - 4,71 (m, 1H) 4,73 (d, J = 10,38 Hz, 1H) 5,75 (d, J = 9,77 Hz, 1H) 6,52 (s, 1H) 7,15 (d, J = 7,02 Hz, 1H) 7,29 - 7,42 (m, 4 H) 7,43 - 7,58 (m, 3H). CLEM: Tr= 2,23 min. $[M+H]^+ = 735$; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Preparación del intermedio 14:



Intermedio 14

Etapa 1:

En una solución de 2-bromo-5-nitrobenzoato de metilo (6 g, 23,07 mmol), carbonato potásico (9,6 g, 69,2 mmol) y ácido 4-bromofenilborónico (6,02 g, 30,0 mmol) en DME (120 ml) y agua (24 ml) (en un vaso de presión) se roció nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió Pd(PPh₃)₃ (0,80 g, 0,692 mmol) y después la reacción se calentó hasta 80 °C durante la noche. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se evaporó. El residuo se diluyó en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, dando el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (0 - 15 % de EtOAc/hexanos), dando 4'-bromo-4-nitrobifenil-2-carboxilato de metilo (7,2 g, 21,42 mmol, rendimiento del 93 %) en forma de un sólido amarillo claro. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 3,75 (s, 3H) 7,19 (m, 2H) 7,52 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 7,58 (m, 2H) 8,37 (dd, J = 8,24, 2,44 Hz, 1H) 8,71 (d, J = 2,44 Hz, 1H).

Etapa 2:

A una solución de 4'-bromo-4-nitrobifenil-2-carboxilato de metilo (7,2 g, 21,42 mmol) en MeOH (110 ml) se añadió cloruro amónico (11,5 g, 214 mmol) y cinc (14,0 g, 214 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El sólido se filtró y se evaporó el filtrado. El residuo se disolvió en éter dietílico, se filtró y se concentró, dando 4-amino-4'-bromobifenil-2-carboxilato de metilo (7,8 g, 25,5 mmol, rendimiento del 119 %). CLEM: Tr = 1,54 min. [M+H]⁺ = 305 y 307; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 0,50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

A una mezcla de 4-amino-4'-bromobifenil-2-carboxilato de metilo (7,8 g, 25,5 mmol) y carbonato potásico (10,9 g, 79 mmol) en acetona (150 ml) se añadió sulfato de dimetilo (7,30 ml, 76 mmol) y se calentó hasta el reflujo durante la noche. La reacción se enfrió y se añadió agua (10 ml) y se continuó agitando durante 1 hora para destruir el exceso del sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se filtró y se evaporó y después el residuo se suspendió en DCM y se lavó con agua. Las fases orgánicas se secaron, se filtraron y se evaporaron, para dar el material bruto. El material bruto se purificó en Biotage (0-20 % de EtOAc:Hex), dando 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carboxilato de metilo (1,9 g, 5,69 mmol, rendimiento del 22 %) como un aceite naranja. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 3,03 (s, 6 H) 3,66 (s, 3H) 6,87 (dd, J = 8,66, 2,89 Hz, 1H) 7,12 - 7,18 (m, 3H) 7,21 (d, J = 8,53 Hz, 1H) 7,46 - 7,51 (m, 2H). CLEM: Tr = 1,86 min. [M+H]⁺ = 335 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

Una solución de hidróxido de litio 2M (8,5 ml, 17,0 mmol) se añadió a una solución de 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carboxilato de metilo (1,9 g, 5,69 mmol) en THF (20 ml) y metanol (20 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se diluyó después con HCl 1M y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, después con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se evaporó, para dar ácido 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carboxílico (1,34 g, 4,19 mmol, rendimiento del 74 %) como un sólido blanco. CLEM: Tr = 1,54 min. [M+H]⁺ = 319 y 321; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

El ácido 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carboxílico (1,34 g, 4,19 mmol) en THF (40 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Gota a gota se añadió complejo de borano tetrahidrofurano (8,37 ml, 8,37 mmol) durante 15 minutos y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua, cloruro amónico saturado y después salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó, para dar (4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-il) metanol (1,25 g, 4,08 mmol, rendimiento del 98 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,93-3,05 (m, 6 H) 4,58 (s, 2H) 6,72 (dd, J = 8,55, 2,75 Hz, 1H) 6,90 (d, J = 2,75 Hz, 1H) 7,14 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 7,21 - 7,25 (m, 2H) 7,44 - 7,55 (m, 2H).

Etapa 6:

A una solución de (4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-il)metanol (1,8 g, 5,88 mmol) en DMSO (50 ml) se añadió IBX (3,29 g, 11,76 mmol) y se agitó a 40 °C durante 3 horas. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con éter dietílico. La capa de éter se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El producto bruto se purificó en Biotage (5-20 % de EtOAc:Hex), dando 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carbaldehído (1,25 g, 4,11 mmol, rendimiento del 70 %) como un sólido amarillo. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,95 - 3,13 (m, 6 H) 7,01 (dd, J = 8,55, 3,05 Hz, 1H) 7,22 (m, 2H) 7,28 - 7,33 (m, 2H) 7,57 (m, 2H) 9,96 (s, 1H).

Etapa 7:

5 A una solución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (2,94 g, 7,40 mmol) en THF (20 ml) se añadió BuLi (2,5M en hexanos, 2,96 ml, 8,22 mmol). La mezcla se agitó a 0 ° C durante 1 hora. Gota a gota se añadió una solución de 4'-bromo-4-(dimetilamino)bifenil-2-carbaldehído (1,25 g, 4,11 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. La mezcla se agotó durante la noche de 0° C hasta la temperatura ambiente. La reacción se filtró y se evaporó. El residuo se diluyó con éter dietílico y se lavó con agua y después con salmuera. La capa de éter se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó en Biotage (5-15 % de EtOAc:Hex), dando 4'-bromo-N,N-dimetil-2-vinilbifenil-4-amina (725 mg, 2,399 mmol, rendimiento del 58 %) como un sólido amarillo. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 2,97 - 3,07 (m, 6 H) 5,20 (d, J = 10,99 Hz, 1H) 5,69 (d, J = 17,40 Hz, 1H) 6,70 (dd, J = 17,40, 10,99 Hz, 1H) 6,76 (dd, J = 8,55, 2,75 Hz, 1H) 6,95 (d, J = 2,44 Hz, 1H) 7,16 (d, J = 8,55 Hz, 1H) 7,21 (m, J = 8,24 Hz, 2H) 7,50 (m, J = 8,55 Hz, 2H).

Etapa 8:

15 En un matraz de fondo redondo se agitó magnesio (62 mg, 2,55 mmol) en N₂ durante 15 minutos para producir raspado de la superficie de las virutas de magnesio. A las virutas de magnesio se añadieron 10 ml de THF y se agitaron durante 30 minutos adicionales. Gota a gota se añadió 4'-bromo-N,N-dimetil-2-vinilbifenil-2-amina (735 mg, 2,432 mmol) en THF (20 ml), gota a gota, a reflujo con agitación enérgica. A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (699 mg, 2,432 mmol) en DCM (20 ml) a temperatura ambiente se añadió la solución de Grignard y se agitó durante 1 hora y después se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se evaporaron, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10-40 % EtOAc en hexanos) para dar 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (330 mg, 0,646 mmol, rendimiento del 27 %) como una espuma amarilla. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,04 (s, 9 H) 0,99 - 1,11 (m, 2H) 2,34 - 2,52 (m, 1H) 2,62 - 2,81 (m, 1H) 3,00 - 3,07 (m, 6 H) 3,68 - 3,81 (m, 1H) 3,82 - 3,89 (m, 3H) 4,17 - 4,34 (m, 3H) 4,49 - 4,68 (m, 1H) 5,19 (dd, J = 11,04, 1,25 Hz, 1H) 5,70 (dd, J = 17,57, 1,25 Hz, 1H) 6,67 - 6,80 (m, 2H) 6,96 (d, J = 2,26 Hz, 1H) 7,16 - 7,22 (m, 1H) 7,34 (m, 2H) 7,49 (m, J = 8,28 Hz, 2H). CLEM: Tr= 1,71 min. [M+H]⁺ = 511 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

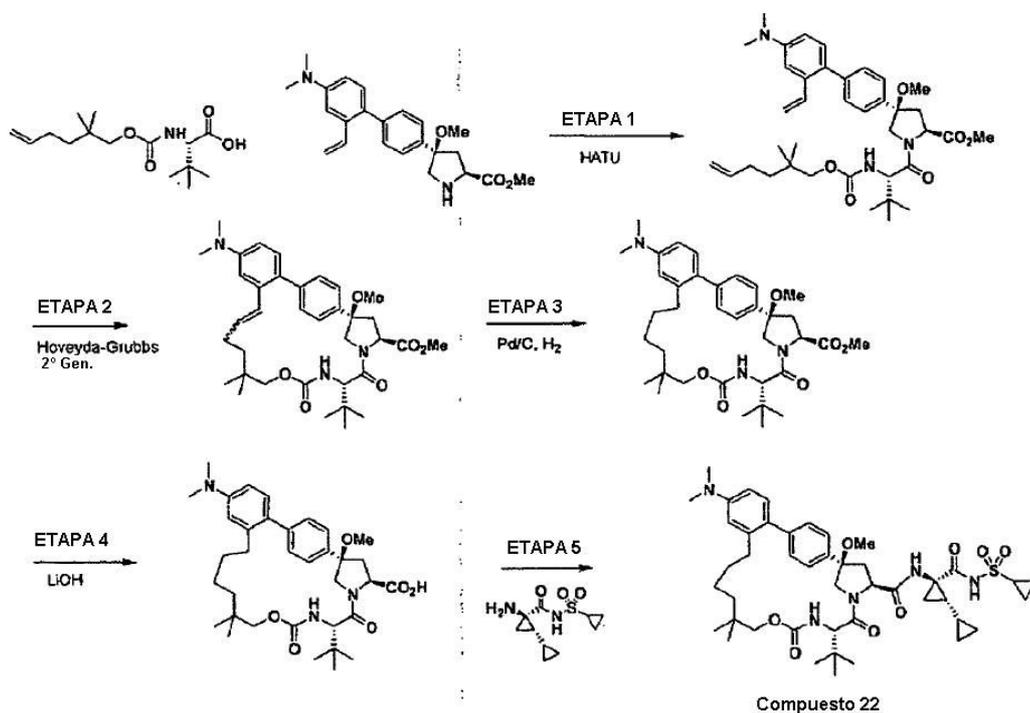
Etapa 9:

30 A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (330 mg, 0,646 mmol) y yoduro de metilo (0,073 ml, 1.163 mmol) a 0 °C en DMF se añadió NaOH (60 % en aceite) (46 mg, 1.163 mmol) a 0 °C en DMF y se agitó a esta temperatura y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante la noche. Después, la reacción se inactivó con una solución de NH₄Cl saturado y éter. La capa de éter se lavó con salmuera, se secó, se filtró y se evaporó, para dar el material bruto. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (5 - 45 % EtOAc en hexanos) para dar el 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (231 mg, 0,440 mmol, rendimiento del 68 %) como un aceite transparente. CLEM: Tr = 1,86 min. [M+H]⁺ = 525 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 10:

45 A una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (231 mg, 0,440 mmol) en THF (5 ml) se añadió TBAF (1,7 ml, en THF, 1,7 ml, 1,7 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se evaporó para dar (2S,4R)-metil-4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato (167 mg, 0,439 mmol, rendimiento del 100 %) como un aceite naranja, que se usó directamente en las siguientes etapas sin purificación adicional. CLEM: Tr = 1,01 min. [M-OMe]⁺ = 349 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

50 **Preparación del Compuesto 22:**



Etapa 1:

5 A una solución de 4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (55 mg, 0,145 mmol) en DCM (3 ml) se añadió ácido (S)-2-((2,2-dimetilhex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (62 mg, 0,217 mmol), DIEA (0,076 ml, 0,434 mmol) y HATU (61 mg, 0,159 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. La reacción se evaporó y se purificó en Biotage (10-45 % de EtOAc en hexanos) para dar 4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-1-((S)-2-((2,2-dimetilhex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (61 mg, 0,094 mmol, rendimiento del 65 %) como un aceite amarillo. CLEM: Tr = 2,00 min. [M-OMe]⁺ = 616 y [M+H]⁺ = 648; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 2:

15 4-(4'-(dimetilamino)-2'-vinilbifenil-4-il)-1-((S)-2-((2,2-dimetilhex-5-eniloxi)carbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metoxipirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (61mg, 0,094 mmol) se disolvió en DCE (15 ml) y se roció con nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (6 mg, 9,42 mmol) y se calentó en un baño de aceite a 80 °C durante la noche. La reacción se enfrió, se evaporó y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en Biotage (10 - 45 % de EtOAc/hexanos), dando el producto semipurificado (53 mg, 0,086 mmol, rendimiento del 91 %) en forma de un aceite transparente. CLEM: Tr = 1,80 min. [M+H]⁺ = 620; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 3:

25 El producto de la etapa 2 (53 mg, 0,086 mmol) en MeOH (3 ml) se pasó a través de un cartucho de 10 % de paladio sobre carbono y se hidrogenó en la máquina H-Cube a 9 MPa de H₂. La reacción se evaporó, para dar el producto bruto (30 mg, 0,048 mmol, rendimiento del 56 %). CLEM: Tr = 1,7 min. [M+H]⁺ = 622 min; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - 0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - 0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 ul; longitud de onda = 220.

Etapa 4:

30 Hidróxido de litio 2,0M (0,072 ml, 0,145 mmol) se añadió a una solución del producto de la etapa 3 (30 mg, 0,048 mmol) en THF (1 ml) y MeOH (1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con HCl 1M y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el producto (26 mg, 0,043 mmol, rendimiento del 89 %) como una espuma blancuzca. CLEM: Tr =

1,55 min. [M+H] = 608; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Etapa 5:

- 5 A una solución del producto de la etapa 4 (26 mg, 0,043 mmol) en DCM (1,5 ml) se añadió DIEA (0,022 ml, 0,128 mmol), HATU (18 mg, 0,047 mmol) y (1S,2R)-2-amino-N-(ciclopropilsulfonil)bi(ciclopropano)-2-carboxamida, sal de HCl (14 mg, 0,051 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción evaporó y se purificó mediante HPLC prep. para dar el compuesto 22 (1 mg, 1.079 μ mol, rendimiento del 2,5 %) como un sólido blanco. RMN de ^1H (500 MHz, CLOROFORMO - d) δ ppm 0,29 (d, J = 4,58 Hz, 2H) 0,49 - 0,63 (m, 1H) 0,77 (t, J = 8,85 Hz, 6 H) 0,83 - 0,93 (m, 6 H) 1,02 (s, 9 H) 1,11 - 1,19 (m, 2H) 1,25 (d, J = 7,93 Hz, 4 H) 1,33 - 1,46 (m, 4 H) 1,82 (d, J = 5,80 Hz, 1H) 2,31 - 2,53 (m, 1H) 2,65 (sa, 2H) 2,98 (s, 6 H) 3,09 (s, 3H) 3,89 - 4,04 (m, 1H) 4,29 (sa, 1H) 4,33 - 4,45 (m, 1H) 5,31 (sa, 1H) 6,55 - 6,75 (m, 3H) 7,07 - 7,17 (m, 1H) 7,28 - 7,32 (m, 4 H) 7,37 (s, 1H). CLEM: Tr = 1,86 min. [M+H] = 834; Phenomenex-Luna C-18 5(μ) (3,0 x 50 mm); Disolvente A = 10 % de acetonitrilo-90 % de agua - -0,1 % de TFA, Disolvente B = 90 % de acetonitrilo -10 % de agua - -0,1 % de TFA; gradiente 0 % a 100 % Disolvente B durante 2 min y después retener durante 1 min.; 4 ml/min; vol. de iny. = 5 μ l; longitud de onda = 220.

Estudios biológicos

En la presente divulgación se usaron ensayos enzimáticos con el complejo de la proteasa NS3/4A del VHC y ensayos del replicón del VHC basados en células y se prepararon, realizaron y validaron del siguiente modo:

Generación del complejo de la proteasa NS3/4A del VHC

- 20 Los complejos de la *proteasa* NS3/4A del VHC derivados de la cepa BMS, la cepa H77 o la cepa J4L6S se generaron como se describe más adelante. Estas proteínas recombinantes purificadas se generaron para usar en un ensayo homogéneo (véase más adelante) para proporcionar una indicación de lo eficaz de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición de la actividad proteolítica de NS3 del VHC.

- 25 El suero de un paciente infectado por VHC se obtuvo del Dr. T. Wright, San Francisco Hospital. Un molde de ADNc de longitud completa sometido a ingeniería (ácido desoxirribonucleico complementario) del genoma del VHC (cepa BMS) se construyó a partir de fragmentos de ADN obtenidos mediante transcripción inversa-PCR (RT-PCR) del ARN (ácido ribonucleico) sérico y usando cebadores seleccionados en base a la homología entre otras cepas del genotipo 1a. A partir de la determinación de la secuencia completa del genoma se asignó un genotipo 1a al aislado del VHC de acuerdo con la clasificación de Simmonds y col. (Véase P Simmonds, KA Rose, S Graham, SW Chan, F McOmish, BC Dow, EA Follett, PL Yap y H Marsden, J. Clin. Microbiol., 31(6), 1493-1503 (1993)). Se mostró que la secuencia de aminoácidos de la región no estructural, NS2-5B, era > 97% idéntica al genotipo 1a del VHC (H77) y un 87 % idéntica al genotipo 1b (J4L6S). Los clones infecciosos, H77 (genotipo 1a) y J4L6S (genotipo 1b) se obtuvieron de R. Purcell (NIH) y las secuencias se publican en Genbank (AAB67036, véase Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. y Bukh, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(16), 8738-8743 (1997); AF054247, véase Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H. y Bukh, J., Virology 244 (1), 161-172. (1998)).

- 35 Las cepas H77 and J4L6S se usaron para producir los complejos de proteasas NS3/4A recombinantes. El ADN que codifica el complejo de proteasas NS3/4A del VHC (aminoácidos 1027 a 1711) para estas cepas se manipuló como han descrito P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkuhler C, De Francesco R. Biochemistry. 38(17):5620-32, (1999)). En resumen, en el extremo 3' de la región de codificación de NS4A se añadió una cola solubilizante de tres lisinas. La cisteína en la posición P1 del sitio de escisión de NS4A-NS4B (aminoácido 1711) se cambió a glicina para evitar la escisión proteolítica de la cola de lisina. Además, mediante PCR se introdujo una mutación de cisteína a serina en la posición del aminoácido 1454 para prevenir la escisión autolítica en el dominio helicasa de NS3. El fragmento de ADN variante se clonó en el vector de expresión bacteriana pET21b (Novagen) y el complejo NS3/4A se expresó en la cepa BL21 de Escherichia coli DE3 (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, De Francesco R., J Virol. 72(8):6758-69 (1998)) con modificaciones. En resumen, la expresión del complejo de proteasa NS3/4A se indujo con Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 milimolar (mM) durante 22 horas (h) a 20 °C. Una fermentación típica (1 litro (l)) dio aproximadamente 10 gramos (g) de pasta celular húmeda. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (10 ml/g) consistente en N-(2-Hidroxietil)Piperazina-N'-(2-Etano ácido sulfónico) (HEPES) 25 mM, pH 7,5, 20 % de glicerol, cloruro sódico (NaCl) 500 mM, 0,5 % de Triton X-100, 1 microgramo/mililitro (" μ g/ml") de lisozima, cloruro de magnesio (MgCl₂) 5 mM, 1 mg/ml de Dnasal, β -Mercaptoetanol (β ME) 5 mM, inhibidor de proteasa-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) libre (Roche), se homogeneizaron e incubaron durante 20 minutos (min) a 4°C. El homogeneizado se sometió a ultrasonidos y se aclaró mediante ultracentrifugación a 235.000 g durante 1 hora (h) a 4 °C. Al sobrenadante se añadió imidazol hasta una concentración final de 15 mM y el pH se ajustó a 8,0. El extracto de proteína bruta se cargó en una columna de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) preequilibrada con tampón B (HEPES 25 mM, pH 8,0, 20 % de glicerol, NaCl 500 mM, 0,5 % de Triton X-100, imidazol 15 mM, β ME 5 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna del tampón C (el mismo que el tampón B a excepción de 0,2 % de Triton-X-100). La proteína se eluyó con 5 volúmenes de columna del tampón D (el mismo que el tampón C a excepción de

con imidazol 200 mM).

Las fracciones que contienen el complejo proteasa NS3/4A se agruparon y cargaron en una columna de desalación Superdex-S200 preequilibrada con tampón D (HEPES 25mM, pH 7,5, 20 % de glicerol, NaCl 300 mM, 0,2 % de Triton X-100, β ME 10 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contienen el complejo proteasa NS3/4A se agruparon y se concentraron hasta aproximadamente 0,5 mg/ml. La pureza de los complejos proteasa NS3/4A derivados de las cepas BMS, H77 and J4L6S se juzgó superior al 90 % mediante análisis SDS-PAGE y espectrometría de masas. La enzima se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descongeló en hielo y se diluyó antes de usar en un tampón de ensayo.

Ensayo con péptido FRET para controlar la actividad proteolítica de NS3/4A del VHC

El objeto de este ensayo *in vitro* era medir la inhibición de los complejos de la proteasa NS3 del VHC derivados de la cepa BMS, la cepa H77 o la cepa J416S, tal y como se ha describe anteriormente, mediante los compuestos de la presente divulgación. Este ensayo ofrece información sobre el grado de eficacia de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición de la actividad proteolítica del VHC.

Con el fin de controlar la actividad de la proteasa NS3/4A del VHC se usó un sustrato peptídico de NS3/4A. El sustrato fue RET S 1 (Resonance Energy Transfer Depsipeptide Substrate; AnaSpec, Inc. N^o cat. 22991) (péptido FRET), descrito por Taliani y col. en *Anal. Biochem.* 240(2):60-67 (1996). La secuencia de este péptido se basa aproximadamente en el sitio de escisión natural de NS4A/NS4B de la proteasa NS3 del VHC, salvo que existe un enlace éster en lugar de un enlace amida en el sitio de escisión. El péptido también contiene un donante de fluorescencia, EDANS, cerca de un extremo del péptido, y un aceptor, DABCYL, cerca del otro extremo. La fluorescencia del péptido se inactiva mediante transferencia de energía de resonancia intermolecular (RET) entre el donante y el aceptor, pero como la NS3 proteasa rompe el péptido, los productos se liberan de la inactivación por RET y la fluorescencia del donante se hace evidente.

El sustrato peptídico se incubó con uno de los tres complejos de la proteasa NS3/4A recombinantes, en ausencia o presencia de un compuesto de la presente divulgación. Los efectos inhibidores de un compuesto se determinaron monitorizando la formación del producto fluorescente de la reacción en tiempo real usando un Cytofluor Series 4000.

Los reactivos fueron los siguientes: HEPES y Glicerol (Ultrapuro) se obtuvieron de GiBCO-BRL. El dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvo de Sigma. El β -Mercaptoetanol se obtuvo de Bio Rad.

Tampón de ensayo: HEPES 50 mM a pH 7,5, NaCl 0,15; Triton 0,1 %; Glicerol 15 %; β ME 10 mM. Sustrato: Concentración final 2 μ M (de una solución madre 2 mM en DMSO conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Proteasa NS3/4A del VHC de tipo 1^a (1b), concentración final 2-3 nM (de una solución madre 5 μ M en HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol 20 %, NaCl 300 mM, Triton-X100 0,2 %, β ME 10 mM). Para los compuestos con potencias cercanas al límite del ensayo, el ensayo se hizo más sensible añadiendo seroalbúmina bovina (Sigma) 50 μ g/ml al tampón de ensayo y reduciendo la concentración final de la proteasa hasta 300 pM.

El ensayo se realizó en una placa negra de poliestireno de 96 pocillos de Falcon. Cada pocillo contenía 25 μ l de complejo proteasa NS3/4A en tampón de ensayo, 50 μ l de un compuesto de la presente divulgación en DMSO 10 %/tampón de ensayo y 25 μ l de sustrato en tampón de ensayo. También se preparó un control (no es un compuesto) en la misma placa de ensayo. El complejo de enzima se mezcló con el compuesto o con una solución control durante 1 minuto antes de iniciar la reacción enzimática mediante la adición de sustrato. La placa de ensayo se leyó inmediatamente usando el Cytofluor Serie 4000 (Perspective Biosystems). El instrumento se ajustó para leer a una emisión de 340 nm y una excitación de 490 nm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las reacciones se siguieron generalmente durante aproximadamente 15 minutos.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación

$$100 - [(\delta F_{\text{inb}}/\delta F_{\text{con}}) \times 100]$$

en la que δ es el cambio en la fluorescencia a lo largo del intervalo lineal de la curva. Se aplicó un ajuste no lineal de la curva a los datos de inhibición-concentración y se calculó la concentración efectiva del 50 % (CI50) usando el software XI-fit y usando la ecuación, $y=A+((B-A)/(1+(C/x)^D))$.

Se determinó que todos los compuestos de la presente divulgación, que se analizaron contra más de un tipo de complejo NS3/4A, tenían propiedades inhibidores similares, aunque los compuestos mostraron de forma uniforme mayor potencia contra las cepas 1b en comparación con las cepas 1a.

Ensayos de especificidad

Los ensayos de especificidad se realizaron para demostrar la selectividad *in vitro* de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición del complejo proteasa NS3/4A del VHC en comparación con otras serina o cisteína proteasas.

Las especificidades de los compuestos de la presente divulgación se determinaron frente a varias serina proteasas: neutrófilo elastasa humana (HNE), elastasa pancreática porcina (PPE) y quimiotripsina pancreática humana y una cisteína proteasa: catepsina B hepática humana B.

5 En todos los casos, se usó un protocolo de formato de placa de 96 pocillos usando sustrato fluorométrico de aminometil-cumarina (AMC) específico de cada enzima como se ha descrito previamente (Solicitud de patente PCT N° WO 00/09543) con algunas modificaciones en los ensayos de la serina proteasa. Todas las enzimas se adquirieron en Sigma mientras que los sustratos eran de Bachem, Sigma y EMDbiosciences.

10 Las concentraciones del compuesto variaron de 100 a 0,4 μM dependiendo de su potencia. Los ensayos enzimáticos se iniciaron cada uno mediante la adición de sustrato al inhibidor enzimático preincubado durante 10 minutos a temperatura ambiente e hidrólisis hasta una conversión del 15% medido en cytofluor.

Las condiciones finales de cada ensayo fueron las siguientes:

clorhidrato de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 50 mM, pH 8, sulfato sódico (Na_2SO_4) 0,5 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DMSO 3 %, Tween-20 0,01 % con LLVY-AMC 5 μM y quimiotripsina 1 nM.

15 Tris-HCl 50 M, pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 0,1mM, DMSO 3 %, Tween-20 0,02 %, succ-AAPV-AMC 5 μM y HNE 20 nM o PPE 8 nM;

NaOAc 100 mM (acetato sódico), pH 5,5, DMSO 3 %, TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato) 1 mM, catepsina B 5 nM (enzima madre activada en tampón que contiene TCEP 20 mM antes de usar) y Z-FR-AMC 2 μM diluido en H_2O .

El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula:

20
$$[1 - ((UV_{\text{inb}} - UV_{\text{blank}})/(UV_{\text{ctl}} - UV_{\text{blank}}))] \times 100$$

Se aplicó un ajuste no lineal de la curva a los datos de inhibición-concentración y se calculó la concentración efectiva del 50 % (CI_{50}) usando el software XI-fit.

Generación del replicón del VHC

25 Se estableció un sistema celular completo de replicón de VHC como se describe en Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R., Science 285(5424): 110-3 (1999). Este sistema permitió a los inventores evaluar los efectos de nuestros compuestos proteasa del VHC sobre la replicación del ARN de VHC. En resumen, usando la secuencia 1b de la cepa de VHC descrita en la publicación de Lohmann (Número de acceso: AJ23879), Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) sintetizó un ADNc de VHC y después se montó el replicón de longitud completa en el plásmido pGem9zf(+) (Promega, Madison, WI) usando técnicas de biología molecular estándar. El replicón consiste en (i) la región 5' UTR del VHC condensada con los 12 primeros aminoácidos de la proteína de la cápsida, (ii) el gen de la neomicina (neo) fosfotransferasa, (iii) el IRES del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) y (iv) los genes de NS3 a NS5B del VHC y la región 3' UTR del VHC.

35 Los ADN plasmídicos se linealizaron con Scal los transcritos de ARN se sintetizaron in vitro usando el kit de transcripción T7 MegaScript (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los transcritos in vitro del ADNc se transfectaron a la línea celular de hepatoma humano, HUH-7. La selección de las células que expresaban constitutivamente el replicón de VHC se consiguió en presencia del marcador seleccionable, neomicina (G418). Las líneas celulares resultantes se caracterizaron según la producción de ARN de hebra positiva y negativa y la producción de proteína con el tiempo.

Ensayo FRET del replicón del VHC

40 El ensayo FRET del replicón del VHC se desarrolló para monitorizar los efectos inhibidores de los compuestos descritos en la divulgación de la replicación viral del VHC. Las células HUH-7 que expresan constitutivamente el replicón de VHC, se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FCS) (Sigma) y 1 mg/ml de G418 (Gibco-BRL). Las células se sembraron la noche anterior ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en placas estériles de cultivo tisular de 96 pocillos. El compuesto y los controles sin compuesto se prepararon en DMEM que contenía FCS al 4 %, penicilina / estreptomycin 1:100, L-glutamina 1:100 y DMSO al 5 % en la placa de dilución (concentración final de DMSO en el ensayo 0,5 %). Las mezclas de compuesto / DMSO se añadieron a las células y se incubaron durante 4 días a 37 °C. Después de 4 días primero se evaluó la citotoxicidad de las células usando azul alamar (Trek Diagnostc Systems) para una lectura en CC_{50} . La toxicidad del compuesto (CC_{50}) se determinó añadiendo 1/10 del volumen de azul alamar al medio de incubación de las células. Tras 4 horas se leyó la señal de fluorescencia de cada pocillo con una longitud de onda de excitación a 530 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm usando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). Después, las placas se enjuagaron minuciosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (3 veces 150 μl). Las células se lisaron con 25 μl de un reactivo de ensayo de lisis que contenía un sustrato de la proteasa de VHC (5X reactivo de lisis de cultivo celular con luciferasa celular (Promega #E153A) diluido a 1X con agua destilada, NaCl

añadido hasta una concentración final de 150 nM, el sustrato péptido FRET (como se ha descrito para el ensayo enzimático anterior) diluido hasta una concentración final de 10 µM de una solución madre 2 mM en 100 % de DMSO. Después, la placa se colocó en el instrumento Cytoflour 4000 que se había ajustado a 340 nm de excitación/490 nm de emisión, en modo automático durante 21 ciclos, y la placa se leyó en modo cinético. Las determinaciones de la CE₅₀ se realizaron como se ha descrito para las determinaciones de la CI₅₀.

Ensayo indicador de luciferasa del replicón del VHC

Como ensayo secundario, Las determinaciones de la CE₅₀ del ensayo FRET del replicón se confirmaron en un ensayo indicador de luciferasa del replicón. La utilización de un ensayo indicador de luciferasa del replicón fue descrito por primera vez por Krieger y col. (Krieger N, Lohmann V, and Bartenschlager R, J. Virol. 75(10):4614-4624 (2001)). El constructo de replicón descrito para el ensayo FRET de los inventores se modificó insertando ADNc que codifica una forma humanizada del gen de la luciferasa de Renilla y una secuencia ligadora condensada directamente con el extremo 3' del gen de la luciferasa. Este inserto se introdujo en el constructo de replicón usando un sitio de restricción Asc1 localizado en el núcleo, directamente cadena arriba del gen marcador de neomicina. La mutación adaptativa en la posición 1179 (serina en isoleucina) también se introdujo (Blight KJ, Kolykhalov, AA, Rice, CM, Science 290(5498):1972-1974). Una línea celular estable que expresa constitutivamente este constructo del replicón del VHC se generó como se ha descrito anteriormente. El ensayo indicador de luciferasa se estableció como se ha descrito para el ensayo FRET del replicón del VHC con las siguientes modificaciones. Tras 4 días en un incubador a 37 °C/5 % de CO₂, las células se analizaron para determinar la actividad de luciferasa de Renilla usando el sistema de ensayos de luciferasa Promega Dual-Glo. Se retiró el medio (100 µl) de cada pocillo que contiene células. A los 50 µl restantes de medio se añadieron 50 µl de reactivo de luciferasa Dual-Glo y las placas se balancearon durante 10 minutos a 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadió el reactivo Dual-Glo Stop & Glo (50 µl) a cada pocillo y las placas se balancearon de nuevo durante 10 minutos a 2 horas más a temperatura ambiente. Las placas se leyeron en un Packard TopCount NXT usando un programa de luminiscencia.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Control} = \frac{\text{señal media de luciferasa en pocillos experimentales (+ compuesto)}}{\text{señal media de luciferasa en pocillos control con DMSO (- compuesto)}}$$

Los valores se representaron gráficamente y se analizaron usando XLfit para obtener el valor de la CE₅₀.

El compuesto de la presente divulgación se analizó y se descubrió que tenía la actividad del siguiente modo: CI₅₀: A = 1 nM -3 nM; B = 4 nM - 7 nM; C = 8 nM - 11 nM; CE₅₀: A = 5,5 nM-10 nM; B = 11 nM-20 nM; C = 21 nM-30 nM.

Tabla 2

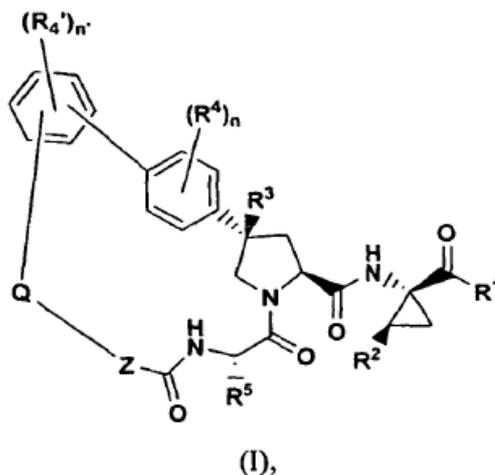
Número de ejemplo	CI ₅₀	CE ₅₀
1	1 nM	5 nM
2	1,5 nM	16 nM
3	B	C
4	A	B
5	B	B
6	A	A
7	A	A
8	C	C
9	4nM	26 nM
10	A	A
11	A	A
12	A	A
13	B	--
14	c	--
15	B	--
16	B	--

18	A	--
19	A	--
20	A	--
21	A	--
22	A	--

5 Será evidente para un experto en la técnica que la presente divulgación no se limita a los anteriores ejemplos ilustrativos, y que puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de sus atributos esenciales. Por lo tanto se desea que los ejemplos sean considerados en todos los aspectos como ilustrativos y como no restrictivos, haciendo referencia a las reivindicaciones anexas, en lugar de a los ejemplos anteriores, y por lo tanto se pretende que todos los cambios que entren dentro del significado y del alcance de equivalencia de las reivindicaciones estén incluidos en las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que

n y n' son, cada uno de forma independiente, 0, 1, 2 o 3;

R¹ se selecciona de hidróxido y -NHSO₂R⁶;

R² se selecciona de hidrógeno, alqueno, alquilo y cicloalquilo, en el que el alqueno, el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o cuatro grupos halo;

R³ se selecciona de hidrógeno, alcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfonilo, alquilsulfoxilo e hidróxido; cada R⁴ y R^{4'} se seleccionan de forma independiente de alcoxi, alquilo, ciano, halo, haloalcoxi, haloalquilo, hidróxido y -NR^aR^b;

R⁵ se selecciona de hidrógeno, alqueno, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo; en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos por un grupo seleccionado de alcoxi, haloalcoxi, halo, haloalquilo, ciano y dialquilamino; R⁶ se selecciona de alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterociclilo y -NR^aR^b; en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, ciano, cianoalquilo y haloalcoxi; R^a y R^b se seleccionan de forma independiente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo;

Q es una cadena de C₄₋₈ saturada o insaturada, en la que la cadena está opcionalmente sustituida con uno, dos, tres o cuatro grupos seleccionados de forma independiente de alquilo, halo y haloalquilo, en la que los grupos alquilo y haloalquilo pueden formar opcionalmente un anillo de 3-7 miembros con el átomo de carbono al que están unidos; y

Z se selecciona de O, CH₂ y NR², en el que R² se selecciona de hidrógeno y alquilo.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ es -NHSO₂R⁶.

3. Un compuesto de la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n y n' son cada uno 0 o 1.

4. Un compuesto de la reivindicación 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es una cadena de C₄₋₇ saturada insustituida y Z es O.

5. Un compuesto de la reivindicación 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R³ es alcoxi.

6. Un compuesto de la reivindicación 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R² se selecciona de alqueno, alquilo sustituido opcionalmente con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido.

7. Un compuesto de la reivindicación 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R⁵ es alquilo.

8. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ es NHSO₂R⁶;

R² se selecciona de alqueno, alquilo sustituido opcionalmente con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido; y R⁵ es alquilo.

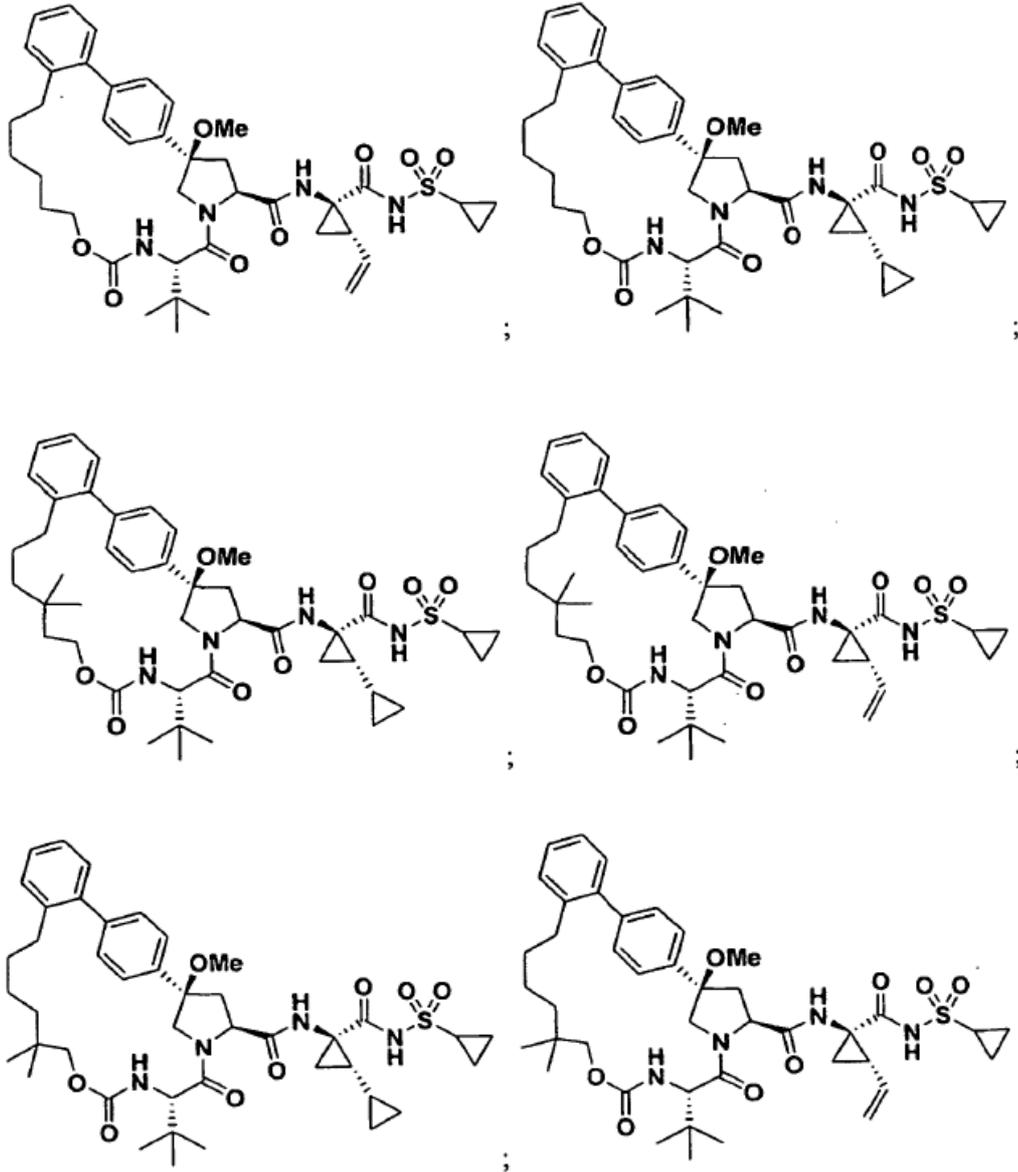
9. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n and n' son cada uno 0 o 1;

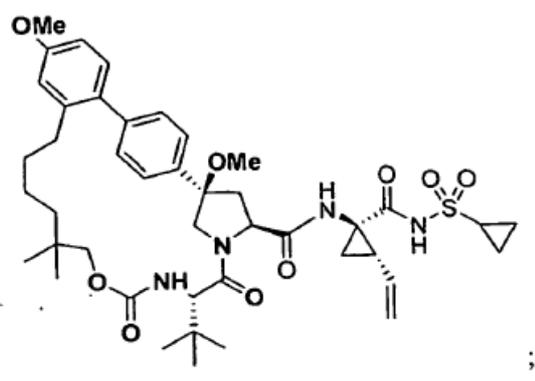
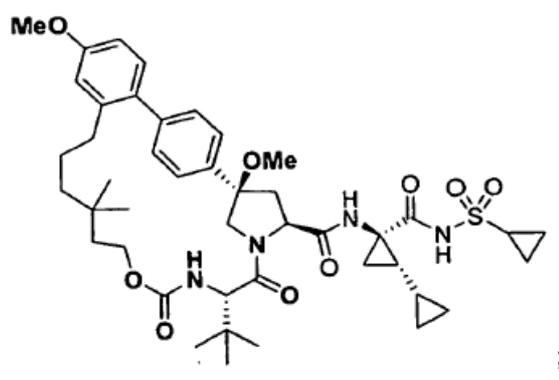
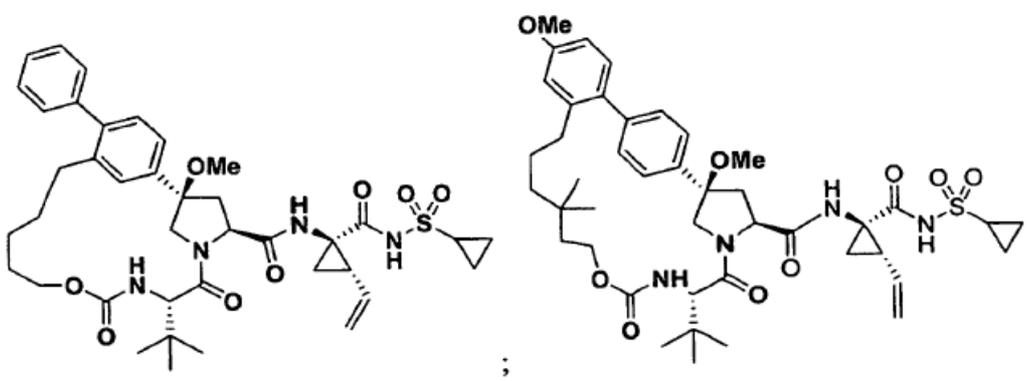
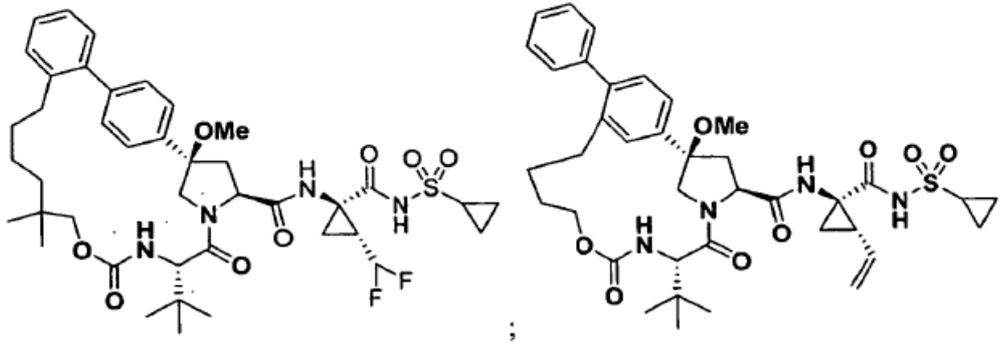
R¹ es NHSO₂R⁶; en el que R⁶ es cicloalquilo;

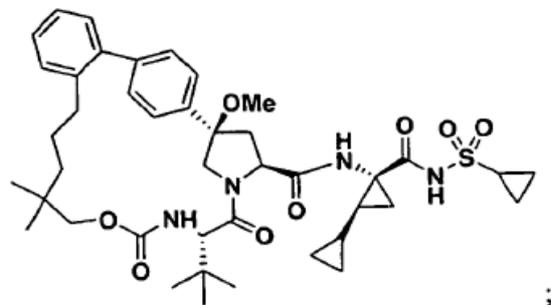
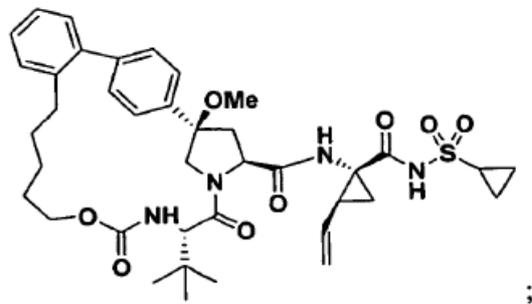
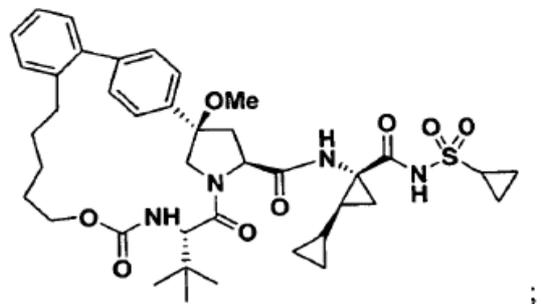
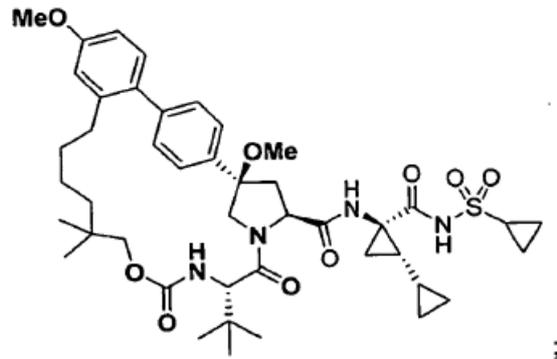
R² es alqueniilo, alquilo sustituido opcionalmente con dos grupos halo y cicloalquilo insustituido;
 R³ es alcoxi;
 R⁵ es alquilo;
 Q es una cadena C₄₋₇ insustituida saturada; y
 Z es O.

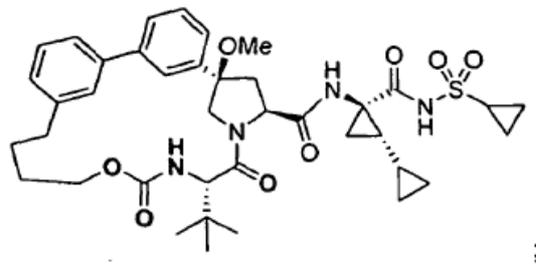
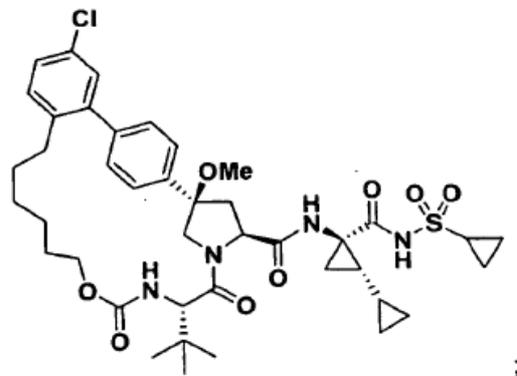
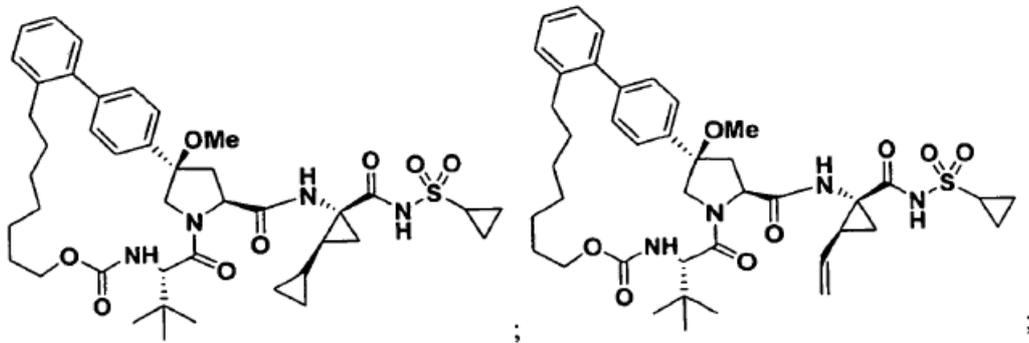
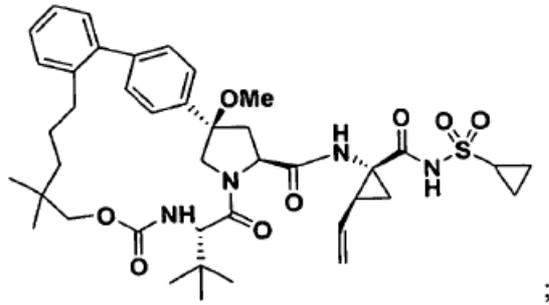
5

10. Un compuesto seleccionado de

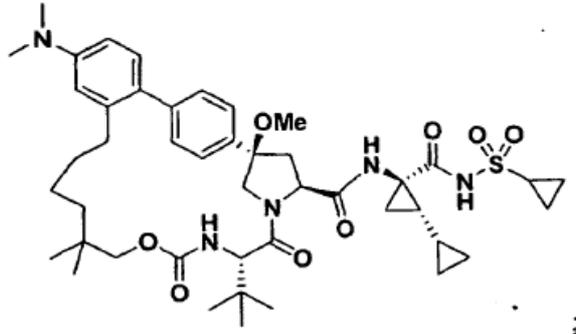








y



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 5 12. La composición según la reivindicación 11, que además comprende un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC.
13. La composición según la reivindicación 12, en el que al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina.
- 10 14. La composición de la reivindicación 13, en la que el interferón se selecciona de interferón alfa-2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa-2A, e interferón tau linfoblastoide.
15. La composición de la reivindicación 12, en la que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona de interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de células T colaboradoras de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y imantadina.
- 15 16. La composición de la reivindicación 12, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada de metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC e IMPDH para el tratamiento de la infección por VHC.
- 20 17. Un compuesto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una infección por VHC en un paciente.
18. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además administrar al menos un compuesto adicional que tenga actividad contra el VHC como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 antes, después o simultáneamente al compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.