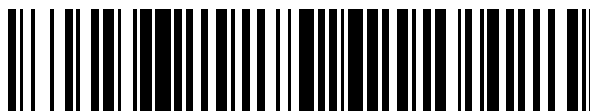


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 916**

51 Int. Cl.:

**C07D 515/08** (2006.01)

**A61K 31/407** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009 E 09806438 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2331554**

54 Título: **Derivados indólicos macrocíclicos útiles como inhibidores del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

**14.08.2008 EP 08162435**

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

**09.07.2013**

73 Titular/es:

**JANSSEN R&D IRELAND (100.0%)  
Eastgate Village  
Eastgate, Little Island, County Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MC GOWAN, DAVID, CRAIG;  
VENDEVILLE, SANDRINE, MARIE, HELENE;  
RABOISSON, PIERRE, JEAN-MARIE, BERNARD y  
TAHRI, ABDELLAH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 411 916 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

Derivados indólicos macrocíclicos útiles como inhibidores del virus de la hepatitis C.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados indólicos macrocíclicos con actividad inhibitoria sobre la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). Se refiere además a composiciones que comprenden estos compuestos como ingredientes activos, así como también a procedimientos para preparar estos compuestos y composiciones.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la hepatitis C es la causa principal de enfermedad hepática crónica en todo el mundo, y se ha convertido en un foco de investigación médica considerable. El VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae* de virus en el género *hepacivirus*, y está estrechamente relacionado con el género *flavivirus*, que incluye cierto número de virus implicados en enfermedades humanas, tales como virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, y con la familia de *pestivirus* de animales, que incluye el virus de la diarrea viral bovina (BVDV). El VHC es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, con un genoma de alrededor de 9.600 bases. El genoma comprende regiones no traducidas tanto de 5' como de 3' que adoptan estructuras secundarias de ARN, y un marco de lectura abierto central que codifica una sola poliproteína de alrededor de 3.010-3.030 aminoácidos. La poliproteína codifica diez productos génicos que se generan a partir de la poliproteína precursora mediante una serie orquestada de escisiones endoproteolíticas co- y post-traduccionales medidas por proteasas tanto del hospedante como víricas. Las proteínas estructurales víricas incluyen la proteína de la nucleocápside central, y dos glucoproteínas E1 y E2 de la cubierta. Las proteínas no estructurales (NS) codifican ciertas funciones enzimáticas víricas esenciales (helicasa, polimerasa, proteasa), así como proteínas de función desconocida. La replicación del genoma vírico está mediada por una ARN polimerasa dependiente de ARN, codificada por una proteína no estructural 5b (NS5B). Además de la polimerasa, se ha demostrado que las funciones de helicasa y proteasa víricas, codificadas ambas en la proteína NS3 bifuncional, son esenciales para la replicación del ARN de VHC. Además de la NS3 serina proteasa, el VHC también codifica una metaloproteinasa en la región NS2.

25 El VHC se replica preferentemente en los hepatocitos pero no es directamente citopático, conduciendo a infección persistente. En particular, la falta de una respuesta enérgica de los linfocitos T y la alta propensión del virus a mutar parecen promover una tasa elevada de infestación crónica. Existen 6 genotipos principales de VHC y más de 50 subtipos, que están distribuidos geográficamente de modo diferente. El VHC tipo 1 es el genotipo predominante en los Estados Unidos de América y en Europa. Por ejemplo, el VHC de tipo 1 es el responsable del 70 a 75 por ciento del total de las infecciones por VHC en los Estados Unidos de América. La amplia heterogeneidad genética del VHC tiene implicaciones diagnósticas y clínicas importantes, explicando quizás las dificultades en el desarrollo de vacunas y la falta de respuesta a la terapia. Se estima que unos 170 millones de personas están infectadas por el virus de la hepatitis C a nivel mundial. Después de la infección aguda inicial, una mayoría de individuos infectados desarrollan hepatitis crónica, que puede progresar a fibrosis hepática, conduciendo a cirrosis, enfermedad hepática de etapa final, y HCC (carcinoma hepatocelular) (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C. *Hepatology*, 36, 5 Supl. S3-S20, 2002). La cirrosis hepática debida a la infección por VHC es responsable de alrededor de 10.000 muertes al año tan solo en los Estados Unidos de América, y es la causa principal de los trasplantes de hígado. La transmisión del VHC puede ocurrir por contacto con sangre o productos de sangre contaminados, por ejemplo después de transfusiones de sangre o uso de fármacos intravenosos. La introducción de ensayos de diagnóstico usados en el cribado de sangre ha conducido a una tendencia decreciente en la incidencia del VHC post-transfusión. Sin embargo, dada la lenta progresión hasta la enfermedad hepática de etapa final, las infecciones existentes continuarán presentando una carga médica y económica importante durante décadas (Kim, W.R. *Hepatology*, 36, Supl. 5, S30-S34, 2002).

45 Las terapias actuales del VHC están basadas en interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) (pegilado) en combinación con ribavirina. Esta terapia de combinación proporciona una respuesta virológica sostenida en más del 40% de los pacientes infectados por los virus del genotipo 1 y alrededor del 80% de los infectados por los genotipos 2 y 3. Además de la eficacia limitada sobre el VHC tipo 1, esta terapia de combinación tiene efectos secundarios importantes y es deficientemente tolerada en muchos pacientes. Por ejemplo, en ensayos para el registro de interferón pegilado y ribavirina, efectos secundarios significativos dieron como resultado la interrupción del tratamiento en aproximadamente el 10 al 14 por ciento de los pacientes. Los efectos secundarios principales de la terapia de combinación incluyen síntomas parecidos a la gripe, anormalidades hematológicas, y síntomas neuropsiquiátricos. El desarrollo de tratamientos más eficaces, convenientes y mejor tolerados es uno de los objetivos principales de la salud pública. De este modo, el tratamiento de esta enfermedad crónica es una necesidad clínica que aún no se ha satisfecho, puesto que la terapia actual solamente es eficaz en parte y está limitada por efectos secundarios no deseados.

55 Un área de interés particular ha sido la búsqueda de inhibidores de la ARN polimerasa dependiente del ARN NS5b (RdRp). Los homólogos estructurales cercanos de esta polimerasa no existen en la célula huésped no infectada, y el descubrimiento de inhibidores de dicha polimerasa proporcionaría un modo de acción más específico. Los inhibidores que se están investigando en la actualidad se pueden clasificar como inhibidores nucleosídicos (NIs) o

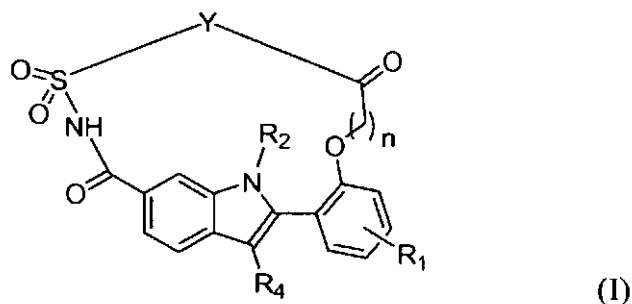
inhibidores no nucleosídicos (NNIs). Los NIs compiten directamente con sustratos nucleotídicos por la unión a sitios activos muy conservados. Se puede conseguir una mayor especificidad por NNIs, que pueden interactuar fuera del sitio activo muy conservado en un único sitio alostérico común solamente para polimerasas estructuralmente relacionadas.

- 5 Se han descrito derivados de indol para la actividad inhibidora del VHC. El documento WO 2007/092000 describe derivados indólicos tetracíclicos como inhibidores de NS5B del VHC para el tratamiento y/o prevención de la infección por el virus del VHC. El documento US 2008/0146537 describe inhibidores de NS5b del VHC indolobenzazepínicos condensados con ciclopropilo. El documento WO 2008/075103 describe derivados indólicos macrocíclicos, útiles para el tratamiento o prevención de la infección por el virus de la hepatitis C.
- 10 Hasta la fecha, los ensayos clínicos preliminares han dado como resultado una tasa elevada de fracaso, destacando de ese modo la necesidad de proseguir la investigación de nuevos inhibidores de NS5b. Existe una elevada necesidad médica de un tratamiento anti-VHC seguro y eficaz. Tales inhibidores de VHC pueden superar las desventajas de la terapia actual contra el VHC, tales como los efectos secundarios, eficacia limitada, la aparición de resistencia, y fracasos de cumplimiento, así como pueden mejorar la respuesta vírica sostenida. En particular, en el
- 15 que los compuestos terapéuticos tienen buena biodisponibilidad y un perfil farmacocinético y metabólico favorable.

Sumario de la invención

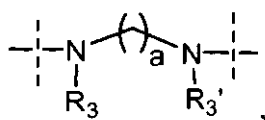
- 20 Se ha encontrado que ciertos derivados indólicos macrocíclicos muestran actividad antivírica en sujetos infectados con VHC, con propiedades útiles con respecto a uno o más de los siguientes parámetros: eficacia antivírica, perfil mutante favorable, falta de toxicidad, perfil farmacocinético y metabólico favorable, y facilidad de formulación y administración. Por lo tanto, estos compuestos son útiles para tratar o combatir infecciones por VHC.

La presente invención se refiere a inhibidores de la replicación del VHC, que se pueden representar mediante la fórmula (I),

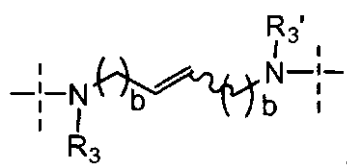


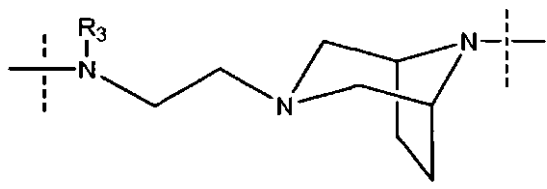
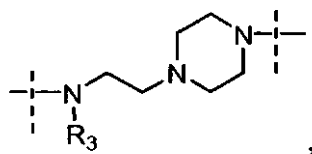
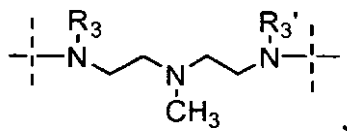
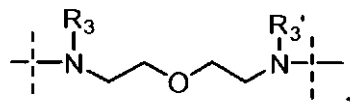
incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos, y solvatos de los mismos, en la que:

- 25 - R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, halo y alcoxi de C<sub>1-4</sub>;
- R<sub>2</sub> se selecciona de alquilo de C<sub>1-4</sub> y cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>;
- R<sub>4</sub> es cicloalquilo de C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido con halo;
- n es 1 ó 2;
- Y se selecciona de

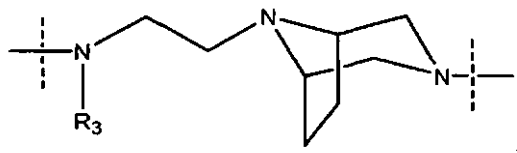


30





5 y



- a es 2, 3, 4 ó 5;
- cada b es independientemente 1 ó 2;
- R<sub>3</sub> y R<sub>3</sub>' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo de C<sub>1-6</sub> y cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>.

10 La invención se refiere adicionalmente a métodos para la preparación de los compuestos de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos o solvatos de los mismos, a sus intermedios, y al uso de los intermedios en la preparación de los compuestos de fórmula (I).

15 La invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) *per se*, incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos o solvatos de los mismos, para uso como un medicamento. La invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) *per se*, incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos o solvatos de los mismos, para tratar la hepatitis C. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo y una cantidad anti-viralmente eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se especifica aquí. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender combinaciones de los compuestos mencionados anteriormente con otros agentes anti-VHC. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente para administración a un sujeto que padece una infección por VHC. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente combinaciones de los compuestos o composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente con agentes anti-VIH. De este modo, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente para administración a un sujeto que sufre una co-infección por VHC/VIH.

25 La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, o sales, hidratos o solvatos del mismo, para la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación del VHC. La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, o sales, hidratos o solvatos del mismo, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar afecciones asociadas con VHC. La invención también se refiere a compuestos para uso en un

método para inhibir la replicación del VHC en un animal de sangre caliente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, o sales, hidratos o solvatos del mismo. La invención también se refiere a compuestos para uso en un método para prevenir o tratar afecciones asociadas con VHC en un animal de sangre caliente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, o sales, hidratos o solvatos del mismo. La invención se refiere adicionalmente a compuestos para uso en un método para prevenir o tratar coinfección por VHC/VIH en un animal de sangre caliente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, o sales, hidratos o solvatos del mismo.

#### 10 Descripción detallada

La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes párrafos se definen diferentes aspectos o realizaciones de la invención con más detalle. Cada aspecto o realización así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos o realización o realizaciones, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas para formular una realización particular.

Como se usa en lo que anterior y en lo sucesivo, se aplican las siguientes definiciones excepto que se indique de otro modo.

Para los fines de la presente invención, los términos “sujeto” o “sujeto infectado” o “paciente” se refieren a un individuo infectado con VHC, que necesita tratamiento.

20 El término “halo” o “halógeno” es genérico para fluoro, cloro, bromo y yodo.

Como se usa aquí, “alquilo de  $C_{1-4}$ ”, como grupo o parte de un grupo, define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, metilo, etilo, prop-1-ilo, prop-2-ilo, but-1-ilo, but-2-ilo, isobutilo, 2-metil-prop-1-ilo; “alquilo de  $C_{1-3}$ ”, como grupo o parte de un grupo, define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen 1 a 3 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, metilo, etilo, prop-1-ilo, prop-2-ilo. “Alquilo de  $C_{1-6}$ ” engloba radicales de alquilo de  $C_{1-3}$  y alquilo de  $C_{1-4}$  y sus homólogos superiores que tienen 5 ó 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, pent-1-ilo, pent-2-ilo, pent-3-ilo, hex-1-ilo, hex-2-ilo, 2-metilbut-1-ilo, 2-metilpent-1-ilo, 2-etilbut-1-ilo, 3-metilpent-2-ilo, y similares. De interés entre alquilo de  $C_{1-6}$  es alquilo de  $C_{1-4}$  y alquilo de  $C_{1-3}$ .

30 El término “alquileo de  $C_{1-6}$ ”, como grupo o parte de un grupo, se refiere a grupos alquilo de  $C_{1-6}$  que son divalentes, es decir, con dos enlaces sencillos para la unión a otros dos grupos. Los ejemplos no limitantes de grupos alquileo incluyen metileno, etileno, metilmetileno, propileno, etiletileno, 1-metiletileno y 1,2-dimeteileno.

“Cicloalquilo de  $C_{3-7}$ ” es genérico para ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. El término “cicloalquilo de  $C_{3-6}$ ” comprende ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. El término “cicloalquilo de  $C_{3-5}$ ” comprende ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo.

35 El término “alcoxi de  $C_{1-4}$ ” o “alquilo de  $C_{1-4}$ ”, como grupo o parte de un grupo, se refiere a un radical que tiene la Fórmula  $-OR^a$ , en la que  $R^a$  es alquilo de  $C_{1-4}$  como se define anteriormente. Los ejemplos no limitantes de alcoxi de  $C_{1-4}$  adecuado incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, sec-butoxi y *terc*-butoxi.

Debe observarse que las posiciones de los radicales en cualquier resto molecular usado en las definiciones pueden estar en cualquier parte en dicho resto, con tal de que sea químicamente estable.

40 Los radicales usados en las definiciones de las variables incluyen todos los isómeros posibles, excepto que se indique de otro modo. Por ejemplo, piperidinilo incluye piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, piperidin-3-ilo y piperidin-4-ilo; pentilo incluye pent-1-ilo, pent-2-ilo y pent-3-ilo.

Cuando cualquier variable aparece más de una vez en cualquier constituyente, cada definición es independiente.

45 Siempre que se use en lo sucesivo, la expresión “compuestos de fórmula (I)”, o “los presentes compuestos” o expresiones similares, debe entenderse que incluye los compuestos de fórmula (I), incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos o solvatos de los mismos. Una realización comprende los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de los mismos especificados aquí, incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, así como sales, hidratos y solvatos de los mismos. Otra realización comprende los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de los mismos especificados aquí, incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, así como sales, hidratos y solvatos de los mismos.

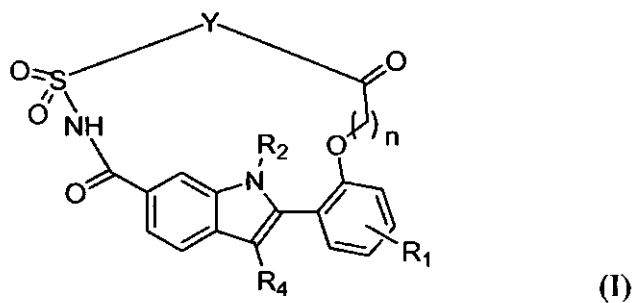
50 Siempre que se use en lo sucesivo, la expresión “opcionalmente sustituido” incluye no sustituido así como sustituido con al menos uno de los radicales sustituyentes especificados. Para los fines del ejemplo, “alquilo de  $C_{1-4}$  opcionalmente sustituido con cloro” incluye alquilo de  $C_{1-4}$  no sustituido así como alquilo de  $C_{1-4}$  sustituido con cloro.

Los compuestos de fórmula (I) pueden tener uno o más centros de quiralidad, y pueden existir como formas

estereoquímicamente isómeras. La expresión "formas estereoquímicamente isómeras", como se usa aquí, define todos los posibles compuestos constituidos por los mismos átomos enlazados por la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que pueden poseer los compuestos de fórmula (I).

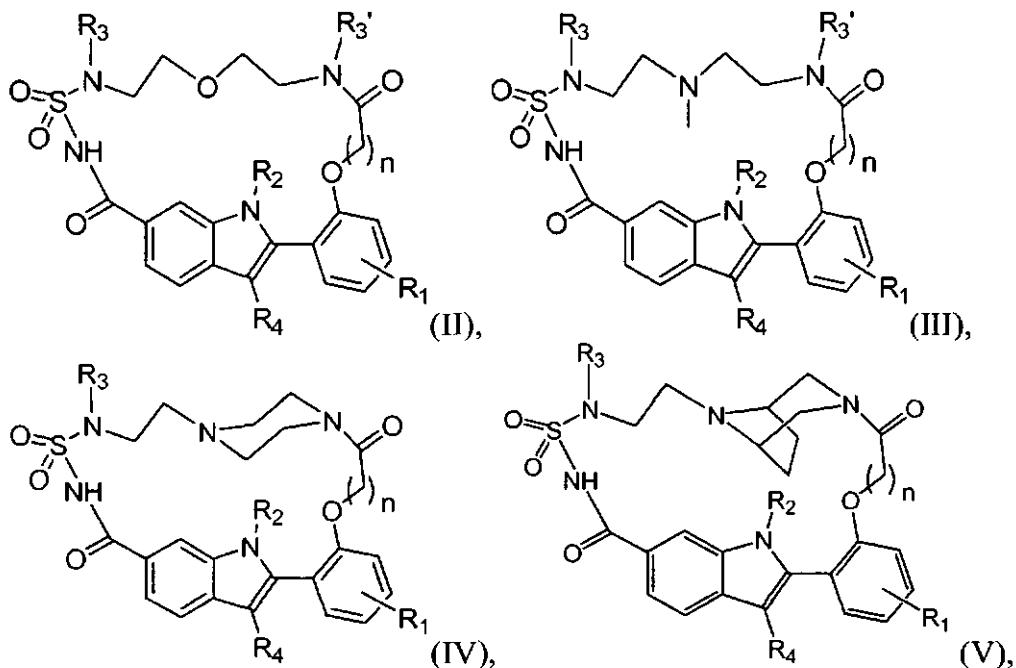
5 Con referencia a los casos en los que se usa (*R*) o (*S*) para designar la configuración absoluta de un átomo quiral en un sustituyente, la designación se hace teniendo en consideración todo el compuesto y no el sustituyente aisladamente.

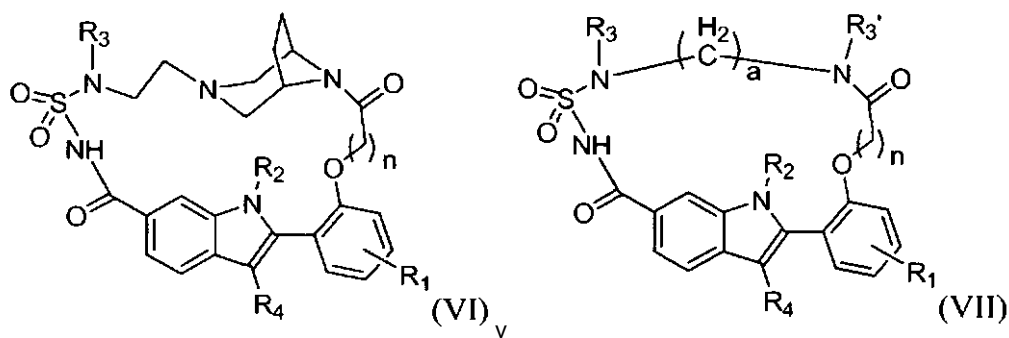
En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I)



10 incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y *N*-óxidos, sales, hidratos y solvatos de los mismos, en la que Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y n tienen el mismo significado como se define aquí.

Subgrupos particulares de compuestos de fórmula (I) son compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI) y (VII)

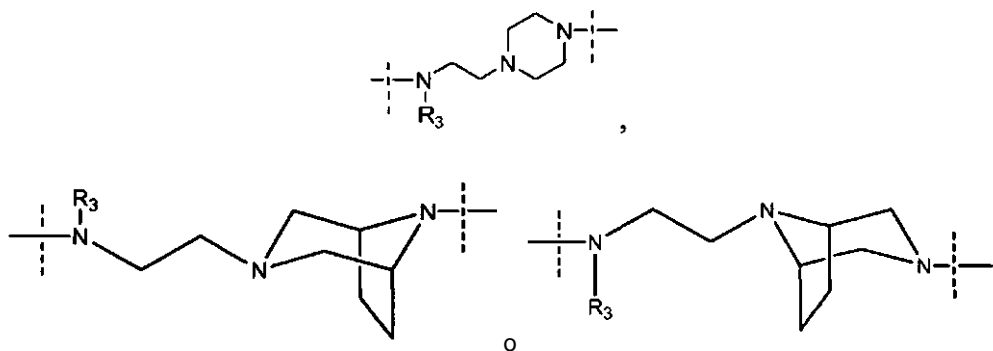




en las que Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>, a y n tienen el mismo significado como se define para los compuestos de fórmula (I) o independientemente cualquiera de sus realizaciones como se define aquí.

Cuando Y es según la fórmula

5



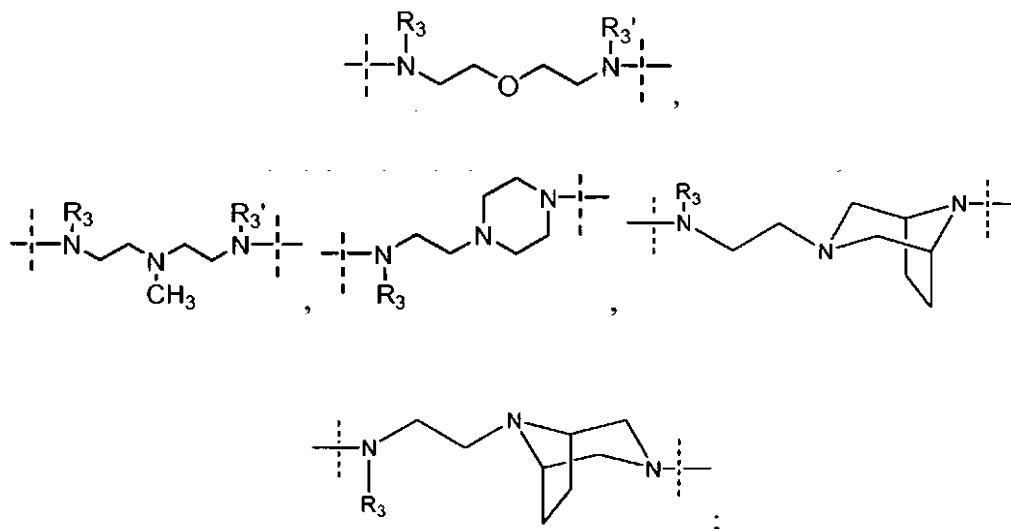
10

se entiende que Y puede estar orientado en dos direcciones, es decir, el resto piperazinílico o 3,8-diaza-biciclo[3.2.1]octánico puede estar conectado al grupo sulfonamida mientras que la amina alifática está conectada al grupo carbonilo, o el resto piperazinílico o 3,8-diaza-biciclo[3.2.1]octánico está conectado al grupo carbonilo y la amina alifática está conectada al grupo sulfonamida.

Realizaciones de la presente invención se refieren a compuestos de fórmula (I), o cualquier subgrupo particular de los mismos como se define aquí, en los que se aplican una o más de las siguientes restricciones:

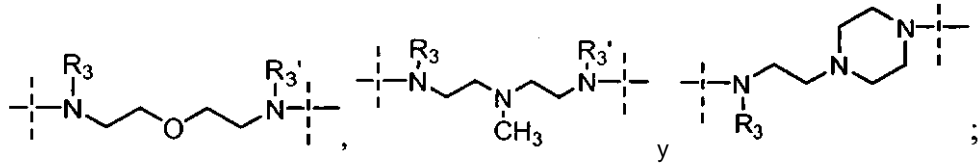
- Y se selecciona de -N(R<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N(R<sub>3</sub>)-,

15

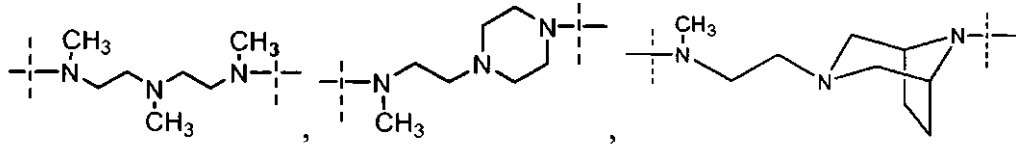
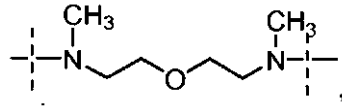


y

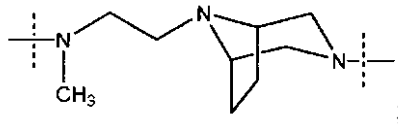
- Y se selecciona de -N(R<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-N(R<sub>3</sub>)-, en la que a es 4 ó 5,



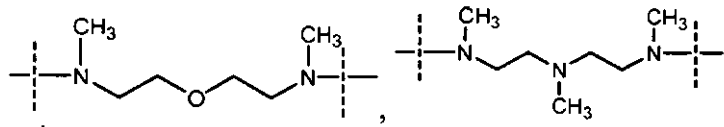
- Y se selecciona de -N(CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-,



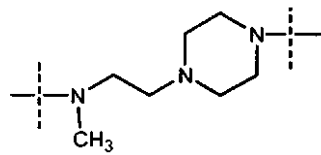
5 y



- Y se selecciona de

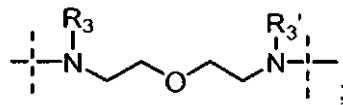


y

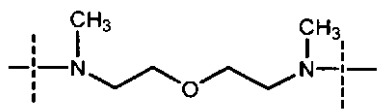


10 en la que el resto piperazínico está conectado al carbonilo y la amina alifática al sulfonilo;

- Y se selecciona de -N(R<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-N(R<sub>3</sub>)- y

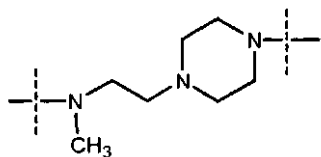


- Y es



15 - Y es

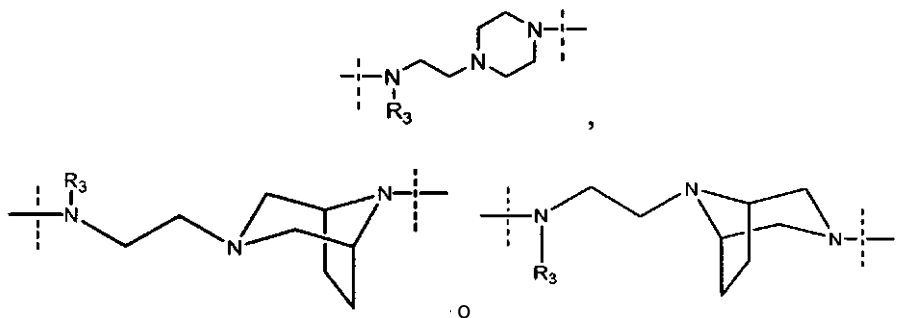




en la que el resto piperazínico está conectado al carbonilo y la amina alifática al sulfonilo;

- Y tiene una longitud de cadena de 7 átomos;
- $R_3$  y  $R_3'$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo y ciclopropilo;
- $R_3$  y  $R_3'$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo;
- $R_3$  y  $R_3'$  son metilo;
- $R_1$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, cloro, fluoro o metoxi;
- $R_1$  es hidrógeno o metoxi o fluoro;
- $R_1$  es hidrógeno
- $R_1$  está situado en el anillo bencénico en meta o para con respecto al enlace que une el benceno al grupo indólico;
- $R_1$  está situado en el anillo bencénico en para con respecto al enlace que une este benceno al anillo indólico;
- $R_2$  se selecciona de metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo y ciclopropilo;
- $R_2$  es metilo o isopropilo;
- $R_2$  es metilo;
- $R_4$  se selecciona de ciclopentilo, ciclohexilo, y fluorociclohexilo, en particular 2-fluorociclohexilo;
- $R_4$  es ciclohexilo;
- n es 1;
- a es 4 ó 5;

En otra realización particular, cuando Y puede ser



- 25 el resto piperazínico o 3,8-diaza-biciclo[3.2.1]octánico está conectado al grupo carbonilo y la amina alifática está conectada al grupo sulfonamida.

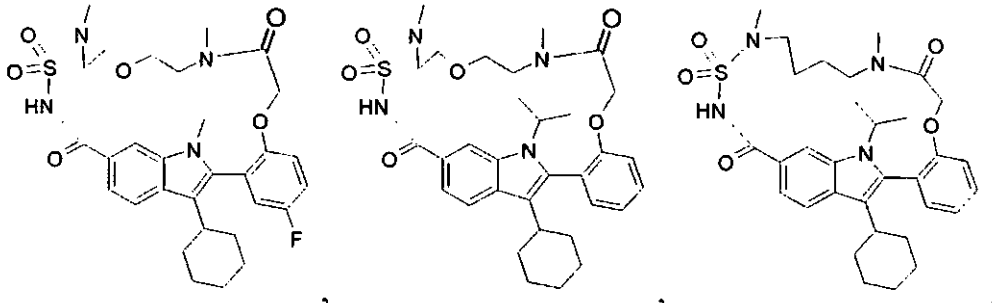
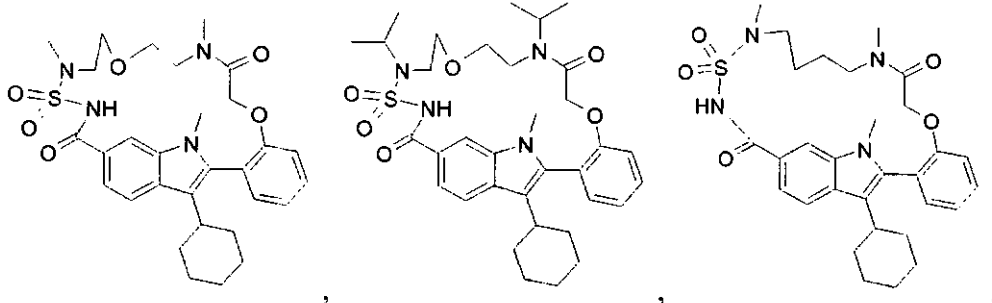
En una realización, la invención proporciona compuestos de, independientemente, fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), en la que  $R_4$  es ciclohexilo o 2-fluorociclohexilo.

- 30 En otra realización, la invención proporciona compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), en la que  $R_1$  es hidrógeno, metoxi, cloro o fluoro.

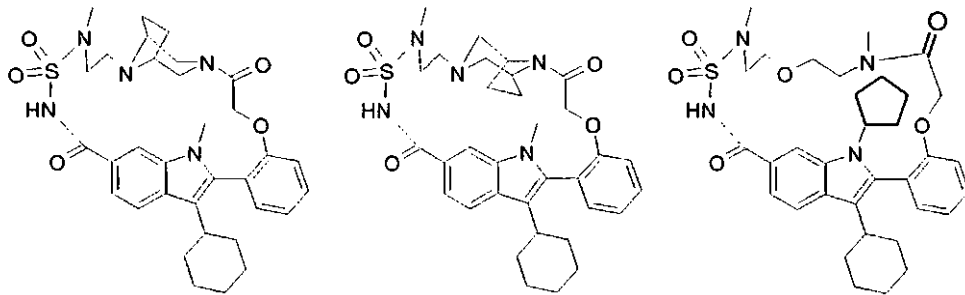
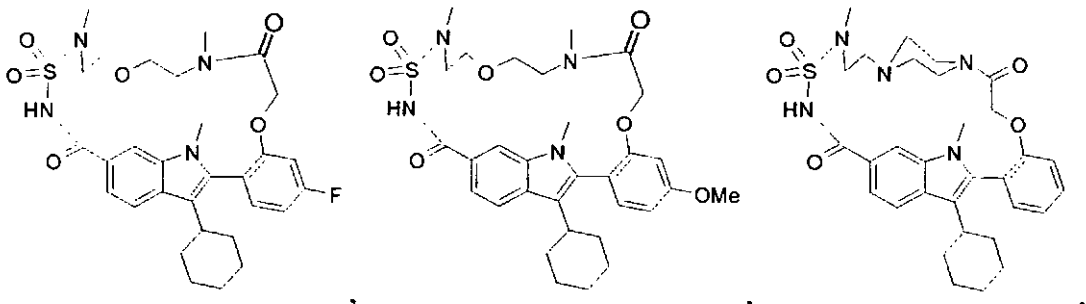
En otra realización, la invención proporciona compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), en la que  $R_2$  es metilo, etilo o isopropilo.

En otra realización, la invención proporciona compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), en la que n es 1.

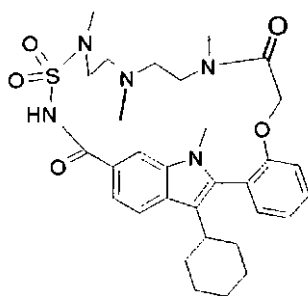
En una realización particular, la invención proporciona compuestos de fórmula (I) seleccionados del grupo que comprende:



5



y



incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, solvatos o hidratos de los mismos.

A no ser que se mencione o indique de otro modo, la designación química de un compuesto engloba la mezcla de algunas o de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles, que puede poseer dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de la presente invención, tanto en forma pura como mezcladas entre sí, deben entenderse englobadas dentro del alcance de la presente invención.

Las formas estereoisómeras puras de los compuestos e intermedios que se mencionan aquí se definen como isómeros sustancialmente exentos de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o intermedios. En particular, la expresión "estereoisoméricamente puro" se refiere a compuestos o intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de al menos 80% (es decir, como mínimo 90% de un isómero y como máximo 10% de los otros isómeros posibles) hasta un exceso estereoisomérico de 100% (es decir, 100% de un isómero y nada del otro); más en particular, compuestos o intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de 90% hasta 100%, incluso más en particular que tienen un exceso estereoisomérico de 94% hasta 100%, y lo más en particular que tienen un exceso estereoisomérico de 97% a 100%. Las expresiones "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" deben entenderse de manera similar, pero haciendo referencia entonces al exceso enantiomérico, y al exceso diastereomérico, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

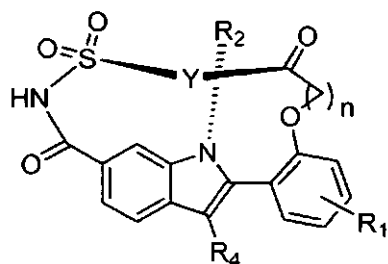
Las formas estereoisómeras puras de los compuestos e intermedios de esta invención pueden obtenerse por la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enantiómeros pueden separarse unos de otros por la cristalización selectiva de sus sales diastereoméricas con ácidos o bases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

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

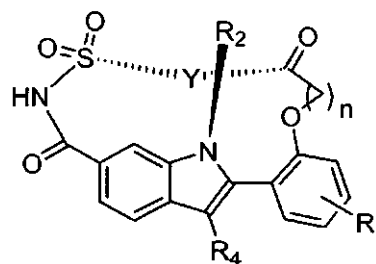
Para algunos de los compuestos de fórmula (I), sus *N*-óxidos, sales, hidratos, o solvatos, y los intermedios usados en la preparación de los mismos, la configuración estereoquímica absoluta no se determinó experimentalmente. Una persona experta en la técnica es capaz de determinar la configuración absoluta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

Sin embargo, aquellos compuestos de fórmula (I) que carecen de un centro quiral o estereogénico en su estructura química pueden tener la ventaja de facilitar el aumento de escala industrial de la síntesis y/o una eficacia de coste mejorada de la síntesis.

Los subgrupos particulares de compuestos de fórmula (I) son compuestos de fórmula (IA) y (IB).



(IA)

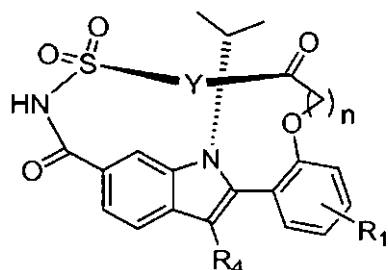


(IB)

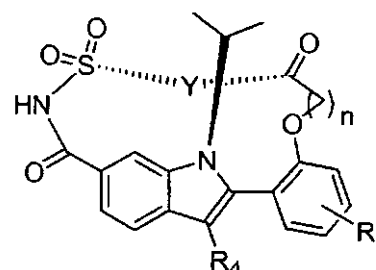
5

Los compuestos de fórmula (IA) y (IB) son isómeros y, dependiendo de la longitud del enlazador bivalente Y y de R<sub>2</sub> (por ejemplo cuando R<sub>2</sub> es isopropilo), los compuestos de fórmula (IA) y (IB) pueden no estar en equilibrio sino bloqueados en su conformación respectiva, es decir, son estables en sus conformaciones respectivas. La conformación de los compuestos de fórmula (I), por ejemplo (IA) o (IB), afecta a las características de los compuestos, incluyendo su estabilidad metabólica, farmacocinética y actividades biológicas.

Realizaciones particulares de compuestos de fórmula (IA) y (IB) son compuestos de fórmula (IA-1) y (IB-1).



(IA-1)



(IB-1)

10

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

15

Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de fórmula (I) son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, ya sean farmacéuticamente aceptables o no, quedan incluidas en el ámbito de la presente invención.

20

Debe entenderse que las sales de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables como se mencionan anteriormente aquí comprenden las formas terapéuticamente activas no tóxicas de sales de adición de ácidos y bases que los compuestos de fórmula (I) son capaces de formar. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente tratando la forma de base con un ácido apropiado de este tipo. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos halohídricos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, y ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumarico, málico (es decir, ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares.

30

De forma inversa, dichas formas de sal pueden convertirse por tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

35

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

Las formas de *N*-óxidos de los presentes compuestos son los compuestos de fórmula (I) o cualquier subgrupo de los mismos en los que uno o varios átomos de nitrógeno están oxidados al denominado *N*-óxido. Tales *N*-óxidos se pueden formar típicamente tras la administración del compuesto de fórmula (I) a un sujeto, con la metabolización en el cuerpo. Como alternativa, tales *N*-óxidos se pueden sintetizar químicamente usando métodos conocidos en la técnica.

5

Algunos de los compuestos de fórmula (I) o cualquiera de sus subgrupos e intermedios también pueden existir en una o más formas tautómeras. Se pretende que tales formas, aunque no se indique de forma explícita en la fórmula anterior, queden incluidas en el alcance de la presente invención. En consecuencia, los compuestos e intermedios pueden estar presentes como una mezcla de tautómeros, o como un tautómero individual.

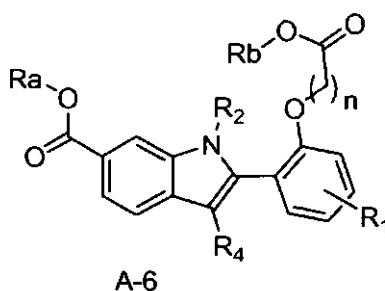
En la invención, se da preferencia particular a compuestos de Fórmula I o cualquier subgrupo de los mismos, que en los ensayos de inhibición descritos más abajo tienen un valor de inhibición menor que 100  $\mu$ M, en particular menor que 50  $\mu$ M, más en particular menor que 10  $\mu$ M, en particular menor que 5  $\mu$ M, incluso más en particular menor que 1  $\mu$ M, preferiblemente menor que 100 nM, y en particular menor que 50 nM, como se determina mediante un ensayo adecuado, tal como los ensayos usados en los Ejemplos más abajo.

Se ha de entender que los subgrupos definidos anteriormente de compuestos de fórmula (I), así como cualquier otro subgrupo definido aquí, pretenden incluir formas estereoquímicamente isómeras, y cualesquiera sales, hidratos y solvatos de tales compuestos.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

Esquemas sintéticos generales

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar siguiendo los diferentes métodos B, C, D, E, F, descritos más abajo, a partir de derivados indólicos A-6, sintetizados como se describe en el método A,

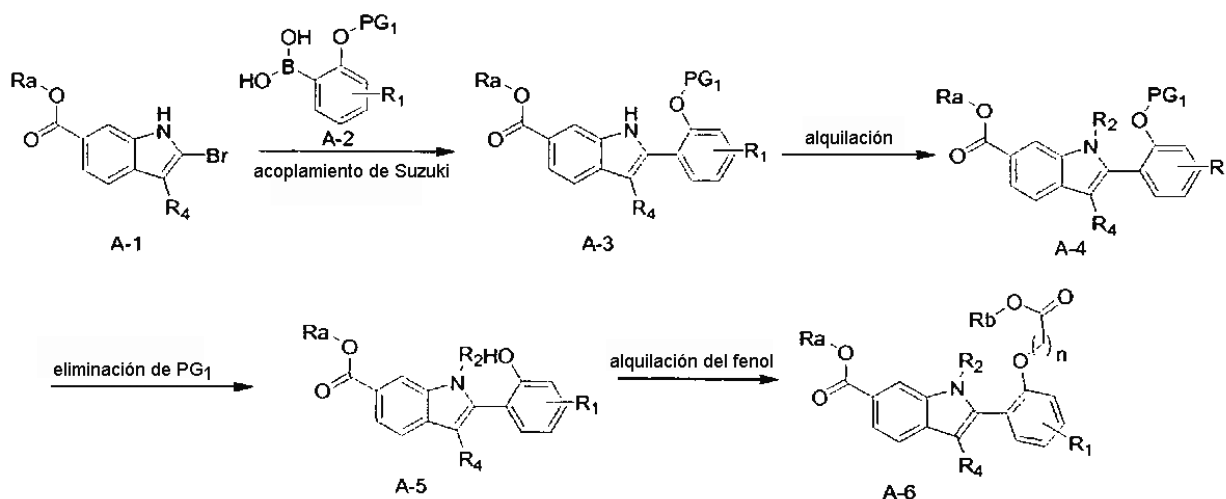


en la que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $n$  son como se definen para los compuestos de fórmula (I) o sus subgrupos, y  $R_a$  se selecciona de metilo y *tert*-butilo, y  $R_b$  se selecciona de metilo o *tert*-butilo. La síntesis de A-1 se describe en el documento WO 2003/010140A2, Journal of Medicinal Chemistry 2005, vol. 48(5), páginas 1314-1317, y en el documento WO 2006/029912A1.

25

Método A

Esquema 1



5 Los compuestos de fórmula A-3 se pueden obtener mediante una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki, entre compuestos A-1 que poseen un sustituyente R<sub>4</sub> y un éster metílico o *terc*-butílico, y un derivado de ácido borónico A-2, que posee un sustituyente R<sub>1</sub> y un hidroxilo protegido mediante un grupo protector adecuado PG<sub>1</sub>, tal como un grupo bencilo. Otros grupos protectores apropiados que se pueden usar se dan por ejemplo en Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nueva York (1999) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 3, Academic Press, Nueva York (1987). Esta reacción se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador de paladio, tal como diCl-*bis*(trifenilfosfino)-Pd(II), y una base, tal como carbonato de potasio, y en un disolvente adecuado tal como una mezcla de dimetoxietano/agua, o tolueno/etanol/agua, en una atmósfera inerte.

10 Los compuestos A-4 se pueden obtener mediante alquilación de compuestos A-3, usando un derivado de haluro de alquilo, por ejemplo yoduro de metilo, en presencia de una base tal como hidruro de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio y similar, en presencia de un disolvente adecuado tal como DMF, THF, acetonitrilo y similar.

15 Los compuestos A-5 se pueden obtener mediante eliminación del grupo protector de fenol PG<sub>1</sub> mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos de desprotección apropiados para el PG<sub>1</sub> usado se describen por Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nueva York (1999) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 3, Academic Press, Nueva York (1987). Por ejemplo, el grupo protector de bencilo se puede eliminar mediante hidrogenación catalítica usando un catalizador de paladio en un disolvente adecuado tal como metanol.

20 Los compuestos A-6 se pueden obtener mediante una reacción de alquilación del fenol, usando por ejemplo un derivado de haloacetato de fórmula X-CH<sub>2</sub>-CO-O-Rb, en la que X es halo. La reacción de alquilación se puede llevar a cabo en presencia de una base tal como carbonato de potasio, carbonato de cesio y similar, en un disolvente adecuado tal como DMF, THF, acetonitrilo y similar. El sustituyente Rb puede ser un metilo cuando Ra es un metilo o un *terc*-butilo, o un *terc*-butilo cuando Ra es un metilo.

#### Método B

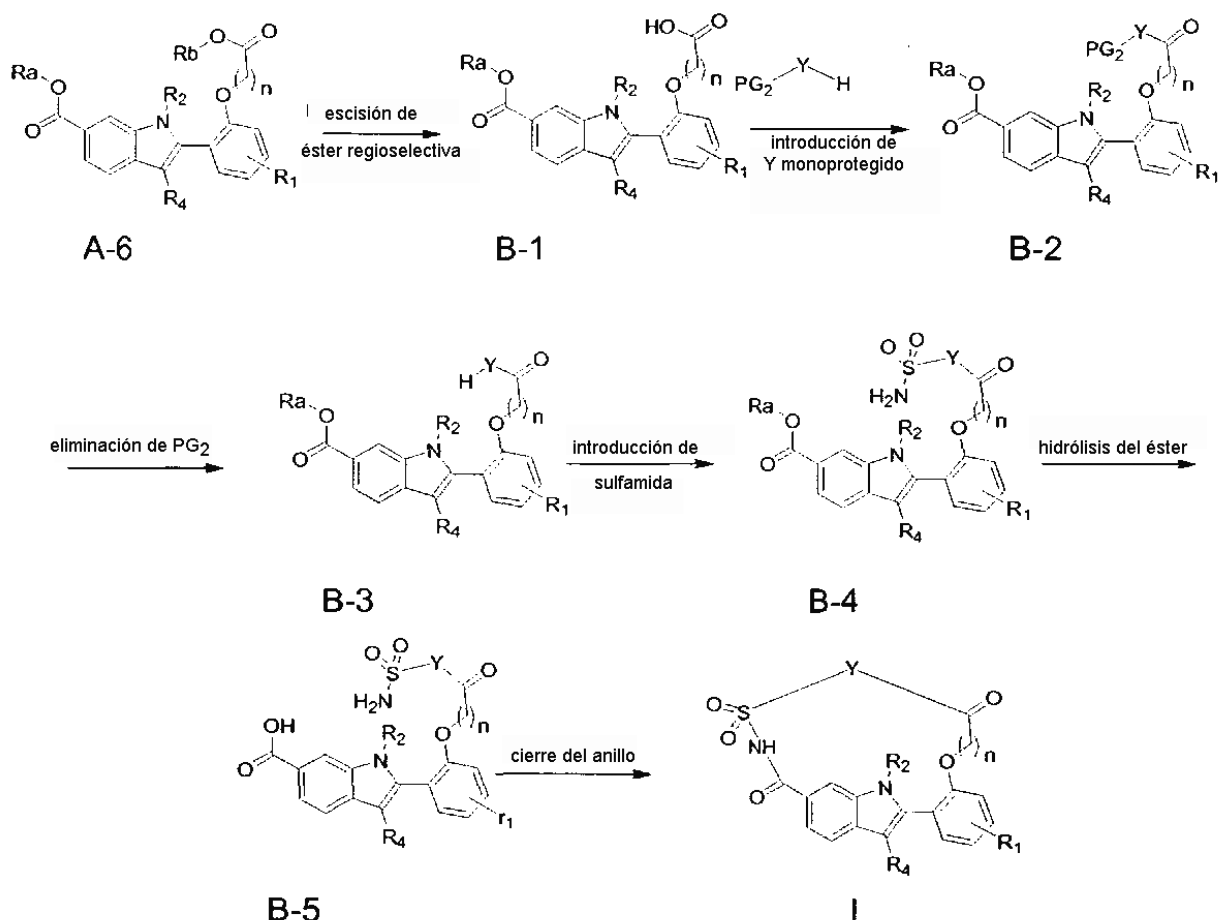
25 En el esquema 2 se da un resumen esquemático para la síntesis de los compuestos de fórmula (I). El método comienza a partir de un compuesto de fórmula A-6.

30 Los compuestos de fórmula **B-1** se pueden preparar mediante la hidrólisis regioselectiva del éster que posee el grupo Rb. Para aquellos compuestos A-6 en los que Rb es un grupo metilo y Ra es un grupo *terc*-butilo o un grupo metilo, la hidrólisis regioselectiva del éster Rb se puede llevar a cabo en condiciones básicas, usando un hidróxido tal como LiOH o NaOH, en disolventes polares tales como agua, un alcohol tal como metanol o etanol, tetrahidrofurano (THF), o una mezcla de los mismos. Como alternativa, cuando Rb es un grupo *terc*-butilo, la hidrólisis regioselectiva del éster que posee el grupo Rb se puede llevar a cabo en condiciones ácidas, usando por ejemplo TFA en un disolvente adecuado, como DCM.

35 Entonces un reactivo derivado de Y bifuncional monoprotegido de fórmula PG<sub>2</sub>-Y-H, en la que Y es como se define para la fórmula (I) o sus subgrupos, se puede acoplar al ácido carboxílico de los compuestos **B-1** para formar un enlace amídico, conduciendo a compuestos **B-2**. "PG<sub>2</sub>", como se usa aquí, es un grupo protector de amina adecuado, escogido de aquellos conocidos en la técnica. Los grupos protectores apropiados que se pueden usar como PG<sub>2</sub> se dan por ejemplo en Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nueva York (1999). En particular, PG<sub>2</sub> es un grupo protector *terc*-butiloxicarbonílico (Boc) o un grupo 2-nitrobenzenosulfonílico (nosilo).

45 La formación de enlaces amídicos puede llevarse a cabo usando procedimientos estándar tales como los usados para acoplar aminoácidos en la síntesis de péptidos. Esto último implica el acoplamiento deshidratante de un grupo carboxilo de un agente reaccionante con un grupo amino del otro agente reaccionante para formar un enlace amídico enlazante. La formación de enlace amídico puede realizarse haciendo reaccionar los materiales de partida en presencia de un agente de acoplamiento o convirtiendo la funcionalidad carboxilo en una forma activa, tal como un éster, anhídrido mixto o un cloruro o bromuro de ácido carboxílico activos. Descripciones generales de tales reacciones de acoplamiento y los reactivos usados en ellas pueden encontrarse en libros de texto generales acerca de química de péptidos, por ejemplo M. Bodanszky, "Peptide Chemistry", 2<sup>a</sup> ed. rev., Springer-Verlag, Berlín, Alemania, (1993).

50 Esquema 2



Ejemplos de reacciones de acoplamiento con formación de enlace amídico incluyen el método de la azida, el método del anhídrido mixto de ácido carbónico-carboxílico (cloroformiato de isobutilo), el método de la carbodiimida (diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), o carbodiimida soluble en agua tal como *N*-etil-*N'*-[(3-dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC)), el método del éster activo (por ejemplo *p*-nitrofenílico, *p*-clorofenílico, triclorofenílico, pentaclorofenílico, pentafluorofenílico, *N*-hidroxisuccinimídico, y ésteres similares), el método del reactivo K de Woodward, el método de 1,1-carbonildiimidazol (CDI o *N,N'*-carbonildiimidazol), los reactivos de fósforo, o métodos de oxidación-reducción. Algunos de estos métodos pueden mejorarse añadiendo catalizadores adecuados, por ejemplo, en el método de la carbodiimida, añadiendo 1-hidroxibenzotriazol, o 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP). Agentes de acoplamiento adicionales son hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-*tris*-(dimetilamino)fosfonio, ya sea por sí mismo o en presencia de 1-hidroxibenzotriazol o 4-DMAP; o tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetra-metiluronio, o hexafluorofosfato de O-(7-azabicyclo[3.2.1]oct-7-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio. Estas reacciones de acoplamiento se pueden llevar a cabo en disolución (fase líquida) o en fase sólida.

Las reacciones de acoplamiento, en particular, se llevan a cabo en un disolvente inerte, tal como hidrocarburos halogenados, por ejemplo diclorometano (DCM), cloroformo, disolventes dipolares apróticos tales como acetonitrilo, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, DMSO, HMPT, éteres tales como tetrahidrofurano (THF).

En muchos casos, las reacciones de acoplamiento se efectúan en presencia de una base adecuada tal como una amina terciaria, por ejemplo trietilamina, diisopropil-etilamina (DIPEA), *N*-metilmorfolina, *N*-metilpirrolidina, 4-DMAP o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). La temperatura de reacción puede estar en un intervalo entre 0°C y 50°C, y el tiempo de reacción puede oscilar entre 15 min. y 24 h.

La eliminación del grupo protector PG<sub>2</sub> siguiendo métodos conocidos en la técnica puede conducir a los compuestos **B-3**. Por ejemplo, cuando PG<sub>2</sub> es un grupo protector Boc, PG<sub>2</sub> se puede eliminar tratando los compuestos **B-2** con ácido trifluoroacético (TFA) en un disolvente adecuado tal como DCM. Cuando PG<sub>2</sub> es un grupo nosilo, PG<sub>2</sub> se puede eliminar tratando los compuestos **B-2** con un tiol como ácido mercaptoacético o tiofenol, en disolución o en fase sólida, en presencia de una base, tal como carbonato de cesio o LiOH, en un disolvente adecuado, tal como DMF, THF. Cuando Ra es un grupo *tert*-butilo y PG<sub>2</sub> es un grupo protector Boc, la eliminación de PG<sub>2</sub> como se describe anteriormente puede conducir a un compuesto **B-3**, siendo Ra OH.

En la siguiente etapa, para la introducción de una sulfamida, los compuestos **B-3** se pueden hacer reaccionar con

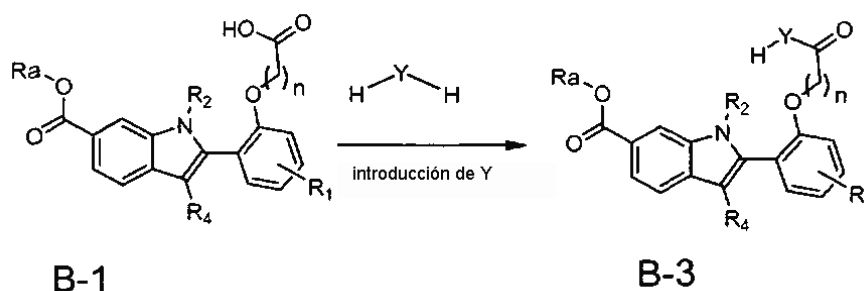
sulfamida, en un disolvente adecuado, por ejemplo dioxano, en condiciones de calentamiento, por ejemplo alrededor de 100°C. Esta reacción puede tener lugar bajo irradiación de microondas, y conduce a los compuestos **B-4**. Como alternativa, el resto sulfamida se puede introducir mediante reacción del compuesto **B-3** con cloruro de aminosulfonilo, en presencia de una base adecuada, tal como trietilamina, DIPEA, o piridina, en un disolvente adecuado, tal como un disolvente clorado como DCM, o DMF, THF.

La función de éster que queda de los compuestos **B-4**, es decir, -CO-O-Ra, se puede hidrolizar entonces, usando condiciones conocidas en la técnica, y que incluyen la saponificación en medio básico como se describe anteriormente, conduciendo a los compuestos **B-5**. Para completar esta reacción, puede ser necesario el calentamiento. También se pueden usar condiciones ácidas para hidrolizar la función éster de compuestos **B-4**, por ejemplo TFA en un disolvente adecuado como DCM, cuando Ra es un grupo *tert*-butilo.

Los compuestos (I) se pueden obtener mediante macrociclación formando el enlace acilsulfamídico intramolecular en presencia de agentes de acoplamiento, tal como CDI, que convierte el grupo ácido carboxílico en una especie acilimidazol reactiva, bajo calentamiento. A continuación, este acilimidazol se puede purificar antes de añadir una base adecuada, tal como DBU, a fin de llevar a cabo el cierre del anillo, que puede tener lugar en condiciones de calentamiento. Los disolventes usados para estas reacciones pueden incluir acetonitrilo o THF. También se pueden usar otros agentes de acoplamiento o condiciones, tales como los conocidos en la técnica o descritos aquí anteriormente, para lograr el cierre del anillo.

#### Método C

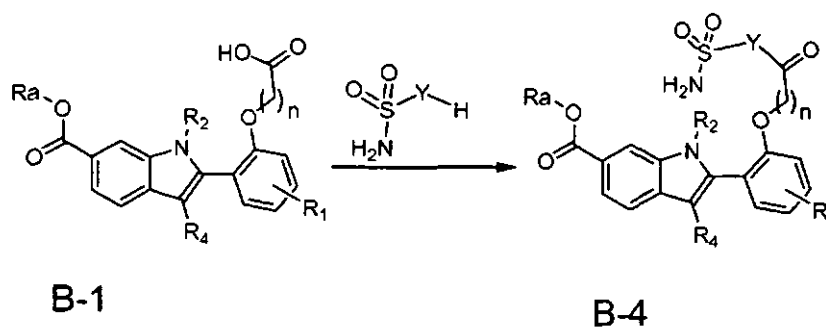
##### Esquema 3



Un método alternativo que conduce a los compuestos **B-3** como se ilustra en el esquema 3 puede ser la formación de un enlace amídico entre compuestos **B-1** y una cadena bivalente simétrica Y, usada en exceso en comparación con los compuestos **B-1**. Este enlace amídico se puede sintetizar como se describió anteriormente, en particular usando un agente de acoplamiento tal como hexafluorofosfato de [dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metileno]dimetilamonio (HATU), en presencia de una base tal como DIPEA, y en un disolvente adecuado como DCM, DMF o más en particular THF. Posteriormente, los compuestos **B-3** se pueden hacer reaccionar como se describe anteriormente en el método B a fin de preparar compuestos (I).

#### Método D

##### Esquema 4



Los compuestos **B-4** se pueden preparar directamente a partir de los compuestos **B-1**, de manera similar a como se describe anteriormente para la síntesis de los compuestos **B-2**, pero usando un Y de cadena bivalente que posee un resto sulfamida en lugar de un grupo protector, es decir, H<sub>2</sub>N-SO<sub>2</sub>-Y-H. La sulfamida se puede introducir en H-Y-H calentando un reactivo de fórmula H-Y-H, el cual puede estar monoprotectido mediante un grupo protector adecuado PG<sub>2</sub> (es decir, PG<sub>2</sub>-Y-H), o no si es simétrico, con sulfamida en un disolvente adecuado, tal como dioxano, bajo irradiación de microondas. El grupo protector PG<sub>2</sub> se puede eliminar entonces por métodos conocidos en la técnica,



por ejemplo mediante reacción con THF en diclorometano cuando el grupo protector es un grupo protector Boc, conduciendo a la cadena Y derivatizada con monosulfamida de fórmula  $H_2N-SO_2-Y-H$ .

#### Método E

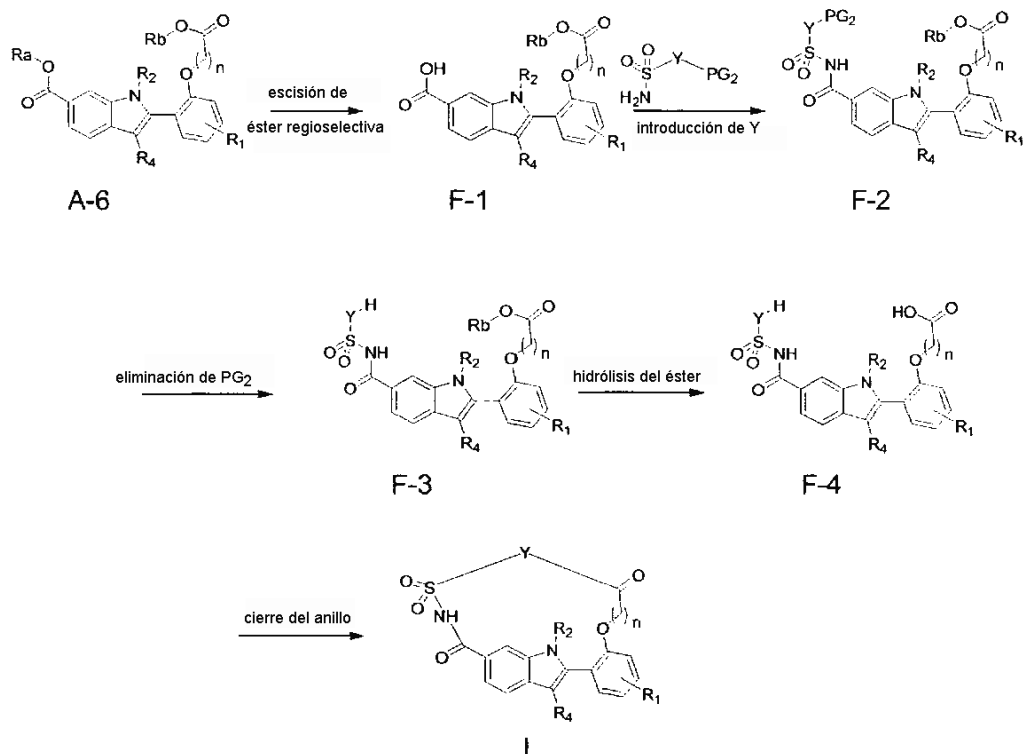
Los compuestos de fórmula **B-2** o **B-3** pueden sufrir manipulación del grupo funcional, tal como alquilación o aminación reductora, antes de la eliminación de  $PG_2$  de los compuestos **B-2** y/o de la reacción que conduce a la sulfamida **B-4**.

#### Método F

El éster que posee el grupo  $R_a$  de los compuestos **A-6** se puede hidrolizar selectivamente como se describe anteriormente para el método B. Por ejemplo, cuando  $R_a$  es un grupo *tert*-butilo y  $R_b$  es un grupo metilo,  $R_a$  se puede eliminar en condiciones ácidas, usando por ejemplo TFA en un disolvente adecuado como DCM, para producir el derivado de ácido carboxílico **F-1**.

El acoplamiento de los compuestos **F-1** con un reactivo de  $H_2N-SO_2-Y-PG_2$  conduce a los compuestos acilsulfamídicos **F-2**. Dicho acoplamiento se puede llevar a cabo usando las condiciones descritas para la última etapa del método B. En particular, el agente de acoplamiento usado para activar el grupo ácido carboxílico de **F-1** puede ser CDI, en un disolvente adecuado como acetonitrilo o THF, en condiciones de calentamiento. La adición de la cadena sulfamídica en presencia de una base tal como DBU puede conducir subsiguientemente a los compuestos **F-2**.  $PG_2$  es un grupo protector de amina adecuado, escogido de los conocidos en la técnica. En particular, en el método E-F,  $PG_2$  es un grupo protector Boc. La eliminación del grupo protector  $PG_2$  de los compuestos **F-2** siguiendo métodos conocidos en la técnica puede conducir a los compuestos **F-3**. Estos métodos incluyen la reacción de compuestos **F-2** con TFA en un disolvente adecuado, tal como DCM, cuando  $PG_2$  es un grupo protector Boc.

#### Esquema 5



La función éster de los compuestos **F-3** (en los que  $R_b$  es un grupo metilo) se puede hidrolizar entonces, usando condiciones conocidas en la técnica, incluyendo la saponificación en medio básico como se describe anteriormente, conduciendo a los compuestos **F-4**.

Como alternativa, los compuestos **F-2** pueden sufrir la reacción de saponificación en medio básico para hidrolizar el éster que posee  $R_b$ , antes de la eliminación del grupo protector de amina  $PG_2$  usando las condiciones descritas anteriormente, y conduciendo a compuestos **F-4**.

Los compuestos **(I)** se pueden obtener mediante macrociclación de los compuestos **F-4** formando el enlace de amida intramolecular, en presencia de agentes de acoplamiento, como se describe en el método B. En particular,

esta etapa de formación de amida se puede llevar a cabo en condiciones de dilución elevada.

Formas estereoquímicamente isómeras puras de los compuestos de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, se pueden obtener por aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Los diastereoisómeros pueden separarse por métodos físicos tales como cristalización selectiva y técnicas cromatográficas, por ejemplo

5

distribución en contracorriente, cromatografía de líquidos, y similares. Los compuestos de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, se pueden obtener como mezclas racémicas de enantiómeros que pueden separarse unos de otros siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, que son suficientemente básicos o ácidos pueden convertirse en las formas de sal diastereoisómeras correspondientes por

10

15

reacción con un ácido quiral adecuado, o una base quiral, respectivamente. Dichas formas de sal diastereoisómeras se separan subsiguientemente, por ejemplo, por cristalización selectiva o fraccionada, y los enantiómeros se liberan de ellas por medio de álcali o ácido. Una manera alternativa de separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, implica cromatografía de líquidos, en particular cromatografía de líquidos usando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras pueden derivarse también de las formas estereoquímicamente isómeras puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, con tal que la reacción transcurra estereoespecíficamente. En particular, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto puede sintetizarse por métodos estereoespecíficos de preparación. Estos métodos pueden emplear ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

20

25

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, como se especifica aquí, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este contexto, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para actuar profilácticamente contra, estabilizar o reducir una infección viral, y, en particular, infección viral de VHC, en individuos infectados o individuos expuestos al riesgo de ser infectados. En todavía otro aspecto, esta invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica como se especifica aquí, que comprende mezclar íntimamente un vehículo farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, como se especifica aquí.

Por lo tanto, según una realización de la presente invención, los compuestos de la fórmula (I), o cualquier subgrupo de los mismos, pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Como composiciones apropiadas, se entiende que están incluidas todas las composiciones empleadas habitualmente para administrar sistémicamente fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina en mezcla íntima una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal o un complejo metálico, como el ingrediente activo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo el cual puede tomar una gran variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, particularmente para administración por vía oral, rectal, percutánea, o por inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y disoluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas, y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros ingredientes, por ejemplo para facilitar la solubilidad. Pueden prepararse, por ejemplo, disoluciones inyectables, en las cuales el vehículo comprende disolución salina, disolución de glucosa o una mezcla de disolución salina y disolución de glucosa. Pueden prepararse también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Se incluyen también preparaciones en forma sólida que tienen por objeto convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes de su uso. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones más pequeñas, aditivos los cuales no introducen un efecto perjudicial significativo en la piel.

30

35

40

45

50

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

55

Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención presentan un perfil farmacocinético favorable tras la administración oral, es decir, una concentración elevada en el hígado y una relación elevada de hígado a plasma. Es ventajoso para los compuestos que inhiben la replicación del VHC presentar concentraciones hepáticas elevadas

60

como réplicas del VHC en el hígado. Una relación elevada de hígado a plasma puede reducir el efecto secundario, y/o disminuir la dosis mínima.

De este modo, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica adaptada para administración por inhalación o insuflación a través de la boca, que comprende un compuesto de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En particular, los compuestos de la presente invención se administran vía inhalación de una disolución en dosis nebulizadas o aerosolizadas.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosis unitaria, como se utiliza aquí, hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosis unitaria son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, supositorios, paquetes de polvos, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, y similares, y múltiples segregados de las mismas.

Los compuestos de fórmula (I), y cualesquiera subgrupos de los mismos, presentan propiedades antivirales. Infecciones virales y sus enfermedades asociadas que pueden tratarse usando los compuestos y métodos de la presente invención incluyen aquellas infecciones causadas por el VHC y otros flavivirus patógenos tales como fiebre amarilla, fiebre del Dengue (tipos 1-4), encefalitis de St. Louis, encefalitis japonesa, encefalitis del valle de Murray, virus del Nilo Occidental y virus Kunjin. Las enfermedades asociadas con VHC incluyen fibrosis, inflamación y necrosis hepática progresiva que conduce a cirrosis, enfermedad hepática de etapa final, y HCC; y para los otros flavivirus patógenos, las enfermedades incluyen fiebre amarilla, fiebre del dengue, fiebre hemorrágica y encefalitis.

Sin embargo, los compuestos de la invención también pueden ser particularmente atractivos debido al hecho de que carecen de actividad frente a otros virus, en particular frente al VIH. Los pacientes infectados por VIH sufren a menudo de coinfecciones tales como VHC. El tratamiento de tales pacientes con un inhibidor de VHC que también inhibe VIH puede conducir a la aparición de cepas resistentes del VIH.

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

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

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

La presente invención se refiere además a compuestos para uso en un método para tratar un animal de sangre caliente infectado por un virus, o que tiene riesgo de infección por un virus, en particular VHC, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad antiviralmente eficaz de un compuesto de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos del mismo, como se especifica aquí.

La presente invención también se refiere a combinaciones de un compuesto de fórmula (I) o cualquier subgrupo del mismo, como se especifica aquí, con otros agentes anti-VHC. En una realización, la invención se refiere a la combinación de un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, con al menos un agente anti-VHC. En una realización particular, la invención se refiere a la combinación de un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, con al menos dos agentes anti-VHC. En una realización particular, la invención se refiere a la combinación de un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, con al menos tres agentes anti-VHC. En una realización particular, la invención se refiere a la combinación de un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, con al menos cuatro agentes anti-VHC.

La combinación de compuesto anti-VHC conocido con anterioridad, tal como interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferón- $\alpha$  pegilado y/o ribavirina, o una combinación de los mismos, y un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, puede utilizarse como medicamento en una terapia de combinación. En una realización, la expresión "terapia de combinación" se refiere a un producto que contiene obligadamente (a) un compuesto de fórmula (I), y (b) al menos algún otro compuesto anti-VHC, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones por VHC, en particular en el tratamiento de infecciones con VHC.

Los compuestos anti-VHC engloban agentes seleccionados de un inhibidor de la polimerasa de VHC, R7128, MK-0608, ABT-33, VCH759, PF-868554, GS9190, NM283, valopicitabina, PSI-6130, XTL-2125, NM-107, R7128

(R4048), GSK625433, R803, R-1626, BILB-1941, HCV-796, JTK-109 and JTK-003, ANA-598, IDX-184, MK-3281, MK-1220, derivados de bencimidazol, derivados de benzo-1,2,4-tiadiazina, derivados de fenilalanina, A-831 y A-689; inhibidores de proteasa del VHC (NS2-NS3 y NS3-NS4A), los compuestos del documento WO02/18369 (véanse, por ejemplo, las líneas 9-22 de la página 273, y la línea 4 de la página 274 a la línea 11 de la página 276), BI-1335, TMC435350, MK7009, ITMN-191, BILN-2061, VX-950, BILN-2065, BMS-605339, VX-500, SCH503034; inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida del VHC, incluida la helicasa, e inhibidores de metaloproteasas, ISIS-14803; agentes inmunomoduladores tales como interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  tales como rIFN- $\alpha$  2b, rIFN- $\alpha$  2ba, IFN- $\alpha$  de consenso (infergen), feron, reaferon, intermax  $\alpha$ , rIFN- $\beta$ , infergen + actimmune, IFN-omega con DUROS, albuferón, locterón, Rebif, IFN- $\alpha$  oral, IFN- $\alpha$  2b XL, AVI-005, infergen pegilado, compuestos de interferón  $\alpha$  derivatizados pegilados tales como rIFN- $\alpha$  2b pegilado, rIFN- $\alpha$  2a pegilado, IFN- $\beta$  pegilado, compuestos que estimulan la síntesis de interferón en células, interleucinas, agonistas de receptores de tipo Toll (TLR), compuestos que fomentan el desarrollo de respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1 y timosina; otros agentes antivirales tales como ribavirina, análogos de ribavirina tales como rebetol, copegus y viramidina (taribavirina), amantadina y telbivudina, inhibidores de la entrada interna del ribosoma, inhibidores de alfa-glucosidasa I tales como MX-3253 (celgosivir) y UT-231 B, hepatoprotectores tales como IDN-6556, ME-3738, LB-84451 y MitoQ, inhibidores virales de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, compuestos de los documentos US5.807.876, US6.498.178, US6.344.465, US6.054.472, WO97/40028, WO98/40381, WO00/56331, ácido micofenólico y sus derivados, e incluyendo, pero sin limitarse a VX-497, VX-148, y/o VX-944); y otros fármacos para tratar VHC tales como zadaxina, nitazoxanida, BIVN-401 (viostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilón (CPG-10101), KRN-7000, civacir, GI-5005, ANA-975, XTL-6865, ANA-971, NOV-205, tarvacina, EHC-18, NIM811, DEBIO-025, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, Bavtuximab, y Oglufanida; o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

De este modo, para combatir o tratar infecciones por VHC, los compuestos de fórmula (I), o cualesquiera subgrupos de los mismos, pueden co-administrarse en combinación con, por ejemplo, interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferón- $\alpha$  pegilado, ribavirina, o una combinación de los mismos, así como agentes terapéuticos basados en anticuerpos dirigidos contra epítomos de VHC, RNA interferente pequeño (si RNA), ribozimas, DNazimas, RNA antisentido, antagonistas de molécula pequeña de, por ejemplo, proteasa de NS3, helicasa de NS3 y polimerasa de NS5B.

Las combinaciones de la presente invención se pueden usar como medicamentos. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), o cualquier subgrupo del mismo, como se define anteriormente, para la fabricación de un medicamento útil para inhibir la actividad del VHC en un mamífero infectado por virus VHC, en el que dicho medicamento se usa en una terapia de combinación, comprendiendo en particular dicha terapia de combinación un compuesto de fórmula (I) y al menos algún otro compuesto inhibidor del VHC, por ejemplo, IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  pegilado, ribavirina, o una combinación de los mismos.

Además, se sabe que un gran porcentaje de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH) también están infectados por VHC, es decir, están coinfectados por VHC/VIH. La infección por VIH parece afectar de forma adversa a todas las etapas de la infección por VHC, lo cual provoca una mayor persistencia vírica y una evolución acelerada de la enfermedad hepática relacionada con el VHC. La infección por VHC puede afectar a su vez al control de la infección por VIH, al incrementar la incidencia de toxicidad hepática provocada por los fármacos antivirales.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a combinaciones de un compuesto de fórmula (I), o cualquiera de sus subgrupos, con agentes anti-VIH. Además, la combinación de uno o más compuestos anti-VIH adicionales y un compuesto de Fórmula (I), o cualquiera de sus subgrupos, se puede utilizar como medicina. En particular, dicha combinación se puede usar para la inhibición de la replicación del VHC y del VIH.

La expresión "terapia de combinación" también engloba un producto que comprende (a) un compuesto de Fórmula (I) o cualquier subgrupo del mismo, y (b) al menos un compuesto anti-VIH, y (c) opcionalmente al menos algún otro compuesto anti-VHC, como una preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o por separado en el tratamiento de infecciones por VHC y VIH, en particular en el tratamiento de infecciones con VHC y VIH, o para prevenir o tratar afecciones asociadas con VHC y VIH.

De este modo, la presente invención se refiere también a un producto que contiene (a) al menos un compuesto de Fórmula (I) o cualquiera de sus subgrupos, y (b) uno o más compuestos anti-VIH adicionales, como una preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o por separado en el tratamiento anti-VHC y anti-VIH. Los diferentes fármacos se pueden combinar en una única preparación junto con vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos compuestos anti-VIH pueden ser cualesquiera compuestos antirretrovirales conocidos, tales como suramina, pentamidina, timopentina, castanospermina, dextrano (sulfato de dextrano), foscarnet sódico (fosfonormiato trisódico); inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTIs), por ejemplo, zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), emtricitabina (FTC), abacavir (ABC), amdoxovir (DAPD), elvicitabina (ACH-126,443), AVX 754 ((-)-DOTC), fozivudina tidoxil (FZT), fosfazida, HDP-990003, KP-1461, MIV-210, racivir (PSI-5004), UC-781 y similares; inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), tales como delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), dapivirina (TMC120), etravirina (TMC125), rilpivirina (TMC278), DPC-082, (+)-Calanolida A, BILR-355, y similares; inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa inversa (NtRTIs), por ejemplo tenofovir ((R)-PMPA) y fumarato de tenofovir disoproxil (TDF), y similares; inhibidores competitivos con nucleótidos de la transcriptasa inversa (NcRTIs), por ejemplo NcRTI-1 y similares; inhibidores de

5 proteínas transactivantes, tales como inhibidores de TAT, por ejemplo, RO-5-3335, BI-201 y similares; inhibidores de REV; inhibidores de proteasas, por ejemplo ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), lopinavir (ABT-378 o LPV), indinavir (IDV), amprenavir (VX-478), TMC126, nelfinavir (AG-1343), atazanavir (BMS 232,632), darunavir (TMC114), fosamprenavir (GW433908 o VX-175), brecanavir (GW-640385, VX-385), P-1946, PL-337, PL-100, tipranavir (PNU-140690), AG-1859, AG-1776, Ro-0334649 y similares; inhibidores de entrada, que comprenden inhibidores de fusión (por ejemplo, enfuvirtida (T-20)), inhibidores de unión e inhibidores correceptores, estos últimos comprenden antagonistas de CCR5 (por ejemplo, ancriviroc, CCR5mAb004, maraviroc (UK-427,857), PRO-140, TAK-220, TAK-652, vicriviroc (SCH-D, SCH-417,690)) y antagonistas de CXR4 (por ejemplo, AMD-070, KRH-27315), ejemplos de inhibidores de entrada son PRO-542, TNX-355, BMS-488043, BlockAide/CR™, FP 21399, hNM01, nonacina, VGV-1; un inhibidor de la maduración es, por ejemplo, PA-457; inhibidores de la integrasa vírica, por ejemplo raltegravir (MK-0518), elvitegravir (JTK-303, GS-9137), BMS-538,158; ribozimas; inmunomoduladores; anticuerpos monoclonales; terapia génica; vacunas; siRNAs; ARN complementarios; microbicidas; inhibidores de dedos de zinc.

15 Por lo tanto, los pacientes infectados por VHC que también padecen afecciones asociadas con VIH, o incluso otros retrovirus patógenos, tales como SIDA, complejo relacionado con el SIDA (ARC), linfadenopatía generalizada progresiva (PGL), así como también enfermedades crónicas del SNC provocadas por retrovirus, tales como, por ejemplo, demencia y esclerosis múltiple mediadas por VIH, se pueden tratar convenientemente con la presente composición.

20 Las composiciones se pueden formular en formas farmacéuticas adecuadas, tales como las formas farmacéuticas descritas anteriormente. Cada uno de los ingredientes activos se puede formular por separado, y las formulaciones se pueden administrar de forma conjunta, o se puede proporcionar una formulación que contenga ambos y, si se desea, otros principios activos.

Como se usa aquí, se pretende que el término “composición” englobe un producto que comprende los ingredientes especificados, así como también cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados.

25 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa aquí, se refiere a la cantidad de compuesto o componente activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica que, a la luz de la presente invención, desea obtener un investigador, veterinario, médico u otro profesional sanitario en un tejido, sistema, animal o humano, la cual incluye la mitigación de los síntomas de la enfermedad que se esté tratando. Debido a que la presente invención se refiere igualmente a combinaciones que comprenden dos o más agentes, la “cantidad terapéuticamente eficaz”, en el contexto de combinaciones, es también aquella cantidad de los agentes combinados de manera que el efecto combinado provoque la respuesta biológica o médica deseada. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda (a) el compuesto de fórmula (I) y (b) otro agente anti-VHC, sería la cantidad del compuesto de fórmula (I) y la cantidad del otro agente anti-VHC que, combinadas, produzcan un efecto combinado que sea terapéuticamente eficaz.

35 En general, se contempla que una cantidad eficaz antiviral diaria estaría comprendida entre 0,01 mg/kg y 500 mg/kg de peso corporal, más en particular entre 0,1 mg/kg y 50 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas farmacéuticas unitarias que contienen, por ejemplo, de 1 a 1000 mg, y en particular de 5 a 200 mg de ingrediente activo por dosis farmacéutica unitaria.

40 La dosis y la frecuencia exacta de administración dependen del compuesto de fórmula (I) particular usado, de la afección particular que se esté tratando, de la gravedad de la afección que se esté tratando, de la edad, peso, sexo, del grado del trastorno y del estado de salud general del paciente particular, así como también de otra medicación que el individuo pueda estar tomando, como bien saben los expertos en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad eficaz diaria se puede reducir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de la presente invención. Por lo tanto, los intervalos de cantidad eficaz diaria mencionados anteriormente aquí son únicamente orientativos.

45 En una realización de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición eficaz para tratar una infección por VHC o para inhibir la polimerasa de NS5B del VHC; y material de envasado que comprende un prospecto que indica que la composición se puede usar para tratar una infección por el virus de la hepatitis C; en el que la composición comprende un compuesto de fórmula (I) o cualquiera de sus subgrupos, o la combinación como se describe aquí.

55 Otra realización de la presente invención se refiere a un kit o recipiente que comprende un compuesto de fórmula (I), o cualquiera de sus subgrupos, en una cantidad terapéuticamente eficaz para uso como estándar o reactivo en una prueba o ensayo para determinar la capacidad de fármacos potenciales para inhibir la polimerasa de NS5B del VHC, el crecimiento del VHC, o ambos. Este aspecto de la invención puede ser útil en programas de investigación farmacéutica.

Los compuestos y las combinaciones de la presente invención se pueden usar en ensayos de analito-diana de alto rendimiento, tales como los de evaluación de la eficacia de dicha combinación en el tratamiento del VHC.

## Ejemplos

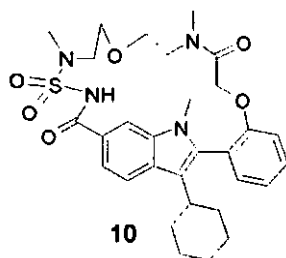
Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar la presente invención y no limitar la misma. Excepto que se indique de otro modo, la purificación de los compuestos sintetizados mediante cromatografía en columna o cromatografía ultrarrápida se lleva a cabo en una columna de gel de sílice.

- 5 Excepto que se indique de otro modo, los productos finales se caracterizaron mediante análisis de LCMS usando una columna SunFire C18 3,5  $\mu$ , 4,6x100 mm, y dos fases móviles: fase móvil A (formiato de amonio ( $\text{NH}_4\text{OOCH}$ ) 10 mM + 0,1% de  $\text{HCOOH}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), y fase móvil B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). La temperatura de la columna fue 50°C, el caudal 2 ml/min, y el gradiente de la fase móvil A y de la fase móvil B se caracterizó como sigue:

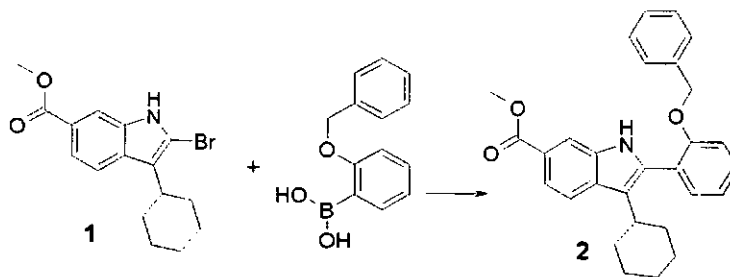
Tiempo (min.)	0	5,4	7,2	7,3	9
% de fase móvil A	95	5	5	95	95
% de fase móvil B	5	95	95	5	5

- 10 Los datos caracterizantes generados por el análisis de LCMS son el tiempo de retención ( $R_t$ ) de la HPLC y la confirmación en la masa molecular ( $m/z$ ).

**Ejemplo 1: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-4,10,19-trimetil-5,6,9,10-tetrahidro-2H,8H-14,18:17,20-di(meteno)-1,7,11,4,10,12,19-benzodioxatitetraazaciclodocosina-3,13(4H,12H,19H)-diona 10.**

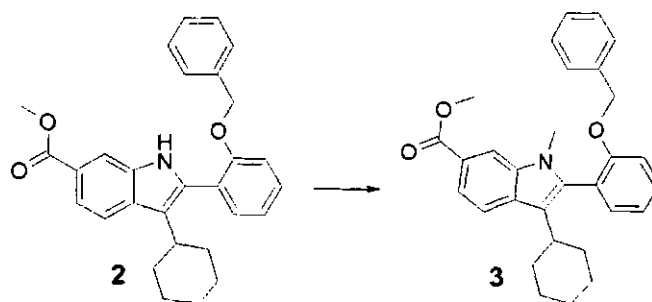


- 15 Etapa 1



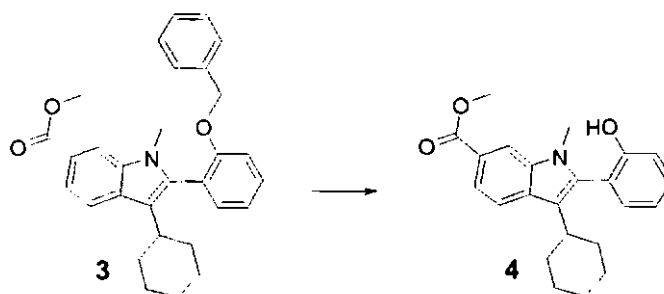
- 20 Una disolución de 2-bromo-3-ciclohexil-1H-indol-6-carboxilato de metilo (**1**, 6,14 g, 18,3 mmoles), ácido 2-(benciloxi)fenilborónico (5,00 g, 21,9 mmoles) y carbonato de potasio (5,80 g, 42 mmoles) en 450 ml de 1,2-dimetoxietano/agua (4:1) se inundó a conciencia con argón. Después se añadió cloruro de *trans*-BIS(trifenilfosfina)paladio(II) (0,641 g, 0,91 mmoles), y la reacción se calentó a 70°C bajo argón durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtraron. La disolución filtrada se concentró a vacío para dar 2-[2-(benciloxi)fenil]-3-ciclohexil-1H-indol-6-carboxilato de metilo **2**:  $m/z = 440$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

- 25 Etapa 2



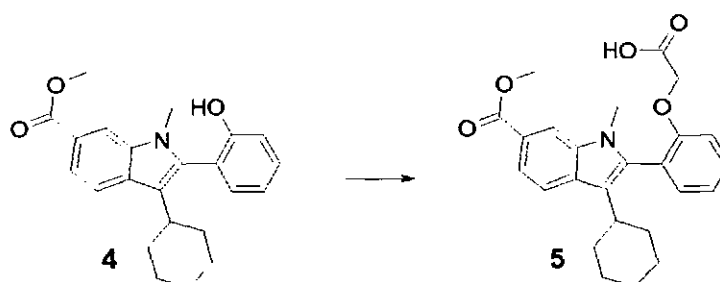
- 5 Se añadió NaH (810 mg, 32,1 mmoles) a una disolución del intermedio **2** (9,4 g, 21,4 mmoles) en DMF seca. Después, se añadió yodometano (3,64 g, 25,7 mmoles) a temperatura ambiente. Tras 12 h, la mezcla de reacción se repartió entre agua (pH 6) y AcOEt. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, y después se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente heptano/AcOEt 1:0 hasta 80:20) para producir 7,8 g (80%) de 2-[2-(benziloxy)fenil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **3**:  $m/z = 454$  (M+H)<sup>+</sup>.

## Etapa 3



- 10 Una disolución del intermedio **3** (4,00 g) en MeOH (36 ml) y AcOH (4 ml) se hidrogenó en presencia de hidróxido de paladio como catalizador. Tras 12 h, la mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se evaporó para dar 3-ciclohexil-2-(2-hidroxifenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **4**:  $m/z = 364$  (M+H)<sup>+</sup>.

## Etapa 4

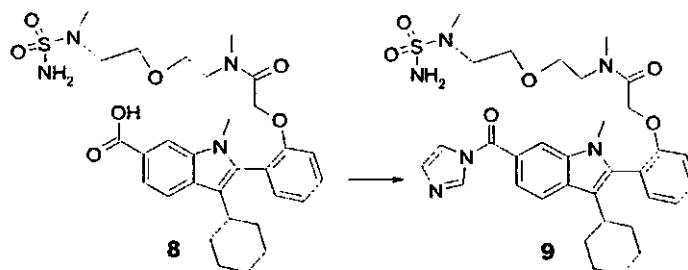


- 15 Una disolución del intermedio **4** (4,00 g, 11,0 mmoles), 2-bromoacetato de *terc*-butilo (2,36 g, 12,1 mmoles) y carbonato de potasio (3,04 g, 22,0 mmoles) se agitó a temperatura ambiente. Tras 72 h, la mezcla de reacción se concentró a vacío, y el residuo se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. La capa orgánica se secó, y el residuo se reconstituyó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml), y se añadió TFA (20 ml). Tras 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a vacío para producir 4,2 g (90%) de ácido [2-[3-ciclohexil-6-(metoxicarbonil)-1-metil-1*H*-indol-2-il]fenoxi]acético **5**:  $m/z = 422$  (M+H)<sup>+</sup>.

## Etapa 5

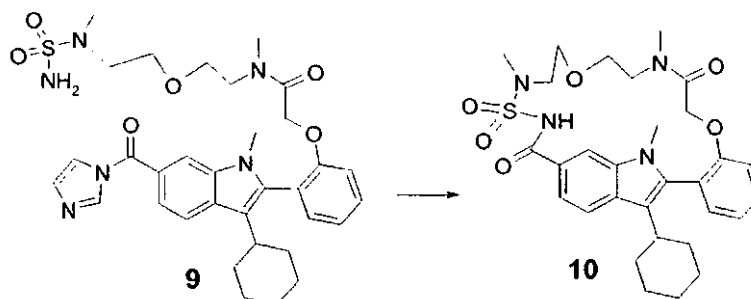






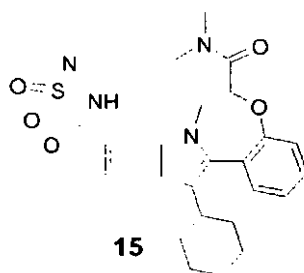
5 Se añadió carbonildiimidazol (405 mg, 2,50 mmoles) a una disolución agitada del intermedio **8** (300 mg, 0,50 mmoles) en acetonitrilo seco (CH<sub>3</sub>CN) (25 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, con lo que se observó la conversión completa. La disolución resultante se evaporó, y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice (gradiente AcOEt/CH<sub>3</sub>CN 1:0 hasta 0:1) para producir 315 mg (97%) de 2-[2-[3-ciclohexil-6-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonyl)-1-metil-1*H*-indol-2-il]fenoxi]-*N*-metil-*N*-(2-[2-[metil(sulfamoil)amino]etoxi)etil]acetamida **9** como un polvo blanco:  $m/z = 651$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 9

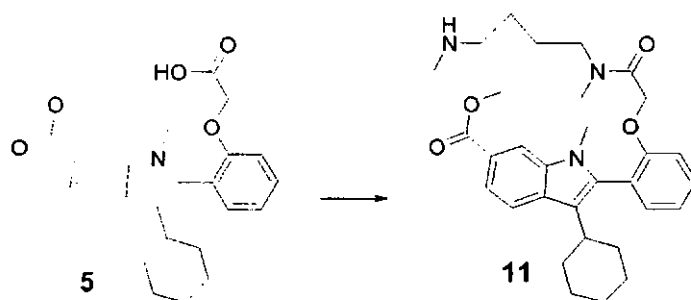


10 Se añadió DBU (147 mg, 0,97 mmoles) a una disolución de **9** (315 mg, 0,48 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (5 ml). La mezcla de reacción se agitó toda la noche a la temperatura ambiente. Después, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5 con AcOH. La disolución se evaporó. El residuo se purificó primero mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente AcOEt/CH<sub>3</sub>CN 1:0 hasta 0:1), y después mediante HPLC preparativa para producir el producto deseado  
15 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-4,10,19-trimetil-5,6,9,10-tetrahidro-2*H*,8*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,7,11,4,10,12,19-benzodioxatetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **10**:  $m/z = 583$  (M+H)<sup>+</sup>, Rt = 5,13 min.

**Ejemplo 2: síntesis de 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-4,9,18-trimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **15**.**

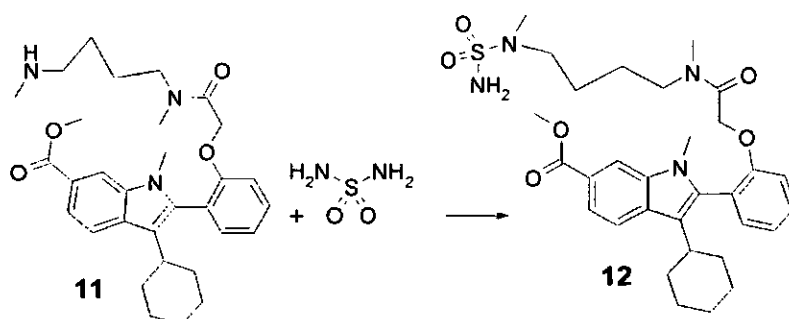


Etapa 1.



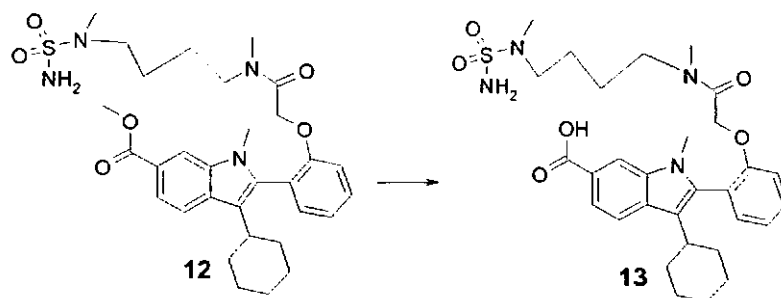
El compuesto **11** se sintetizó con un rendimiento de 88% a partir del intermedio **5** y *N,N'*-dimetilbutilendiamina siguiendo el procedimiento dado a conocer para la síntesis de 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-(2-{metil[4-(metilamino)butil]amino}-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **6**:  $m/z = 520$  (M+H)<sup>+</sup>.

5 Etapa 2.



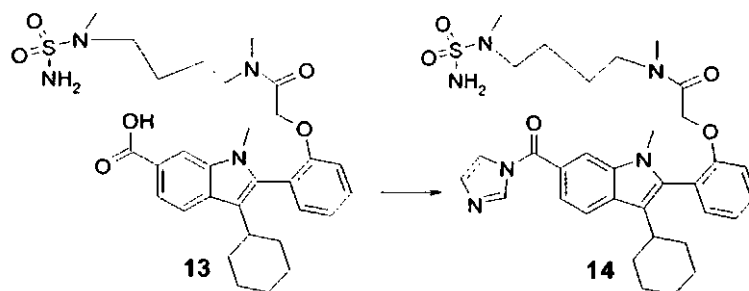
Se sintetizó 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-[2-(metil{4-[metil(sulfamoil)amino]butil]amino}-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **12** con un rendimiento de 68% a partir del intermedio **11** siguiendo el procedimiento dado a conocer para la síntesis del intermedio **7**:  $m/z = 599$  (M+H)<sup>+</sup>.

10 Etapa 3.



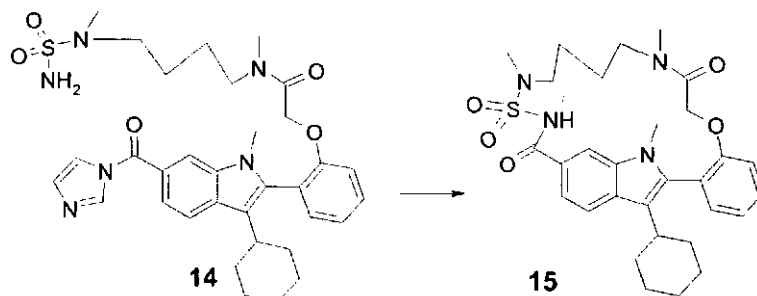
Se sintetizó ácido 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-[2-(metil{4-[metil(sulfamoil)amino]butil]amino}-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxílico **13** con un rendimiento de 78% a partir del intermedio **12** siguiendo el procedimiento dado a conocer para la síntesis del intermedio **8**:  $m/z = 585$  (M+H)<sup>+</sup>.

15 Etapa 4.



Se sintetizó 2-{2-[3-ciclohexil-6-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonil)-1-metil-1*H*-indol-2-il]fenoxi}-*N*-metil-*N*-(4-[metil(sulfamoyl)amino]butil)acetamida **14** con un rendimiento de 92% a partir del intermedio **13** siguiendo el procedimiento dado a conocer para la síntesis del intermedio **9**:  $m/z = 635$  (M+H)<sup>+</sup>.

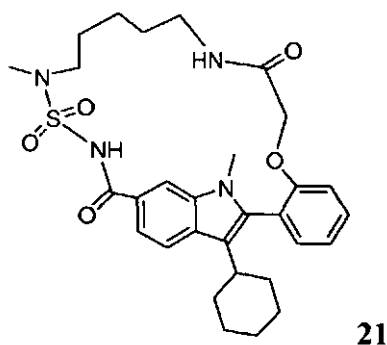
5 Etapa 5.



Se sintetizó 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-4,9,18-trimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatietetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **15** con un rendimiento de 12% a partir del intermedio **14** siguiendo el procedimiento dado a conocer para la síntesis del producto **10**:  $m/z = 567$  (M+H)<sup>+</sup>, Rt = 5,07 min.

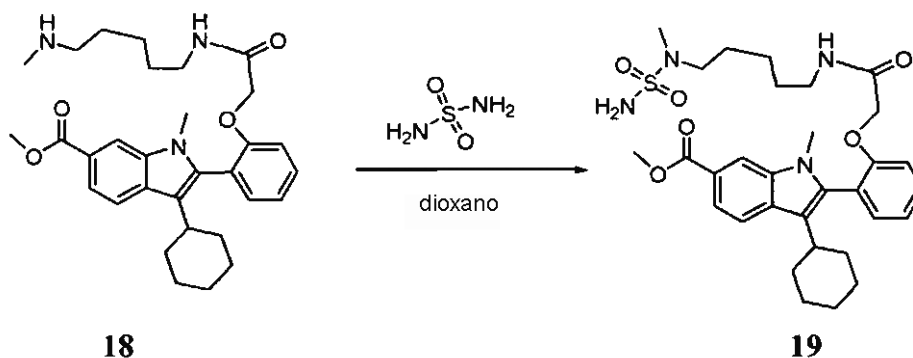
10

**Ejemplo 3: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-10,19-dimetil-5,6,7,8,9,10-hexahidro-2*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,11,4,10,12,19-benzoxatietetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **21****



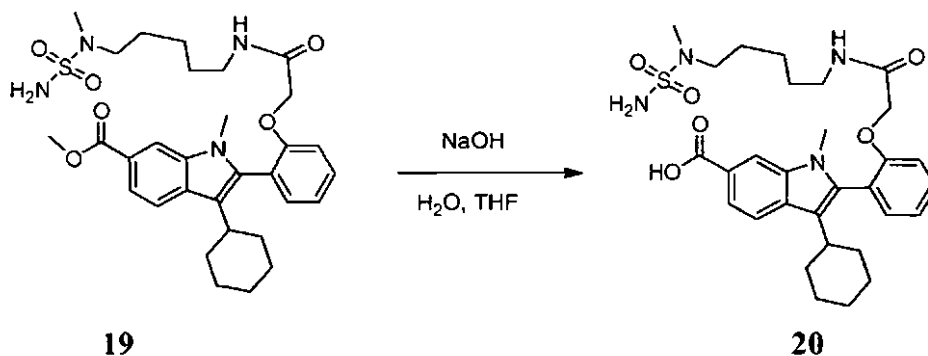
Etapa 1





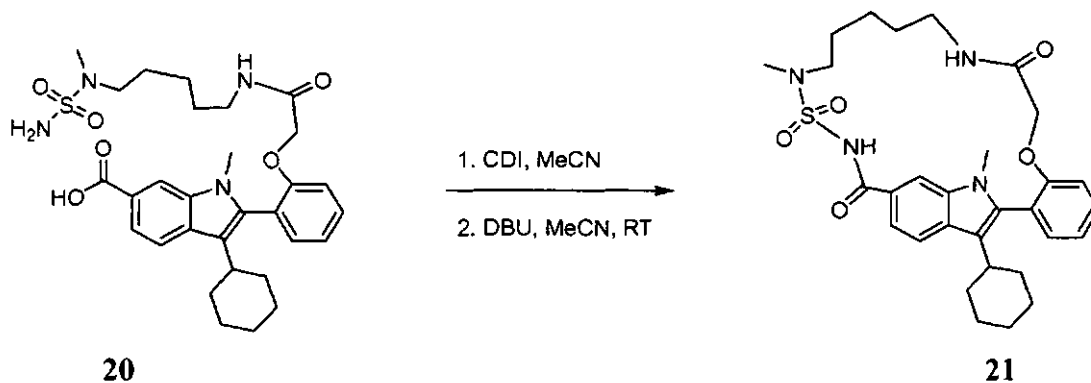
A una disolución de 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-(2-[[5-(metilamino)pentil]amino]-2-oxoetoxi]fenil)-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **18** (0,460 g, 0,885 mmoles) en dioxano (10 ml) se añadió sulfamida (0,851 g, 8,85 mmoles). La mezcla resultante se agitó a 100°C en un horno de microondas durante 4 horas, y después a 105°C durante 6 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después se concentró. El residuo se trituró en diclorometano, y el precipitado resultante de sulfamida en exceso se separó por filtración. El disolvente se eliminó entonces, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de metanol en diclorometano para dar 447 mg (84%) del producto del título 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-(2-((5-[metil(sulfamoil)amino]pentil)amino)-2-oxoetoxi]fenil)-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **19**;  $m/z = 599$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 4



A una disolución de 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-(2-((5-[metil(sulfamoil)amino]pentil)amino)-2-oxoetoxi]fenil)-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **19** (480 mg, 0,802 mmoles) en THF (50 ml) se añadió una disolución de hidróxido de sodio (1,283 g, 40 eq.) en agua. La mezcla resultante se agitó a RT toda la noche. La mezcla se vertió entonces sucesivamente en agua, se acidificó hasta pH = 5 con HCl, se extrajo con diclorometano, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de metanol en DCM para dar 330 mg (70%) del producto del título ácido 3-ciclohexil-1-metil-2-[2-(2-((5-[metil(sulfamoil)amino]pentil)amino)-2-oxoetoxi]fenil)-1*H*-indol-6-carboxílico **20** como un sólido blanco;  $m/z = 585$  (M+H)<sup>+</sup>.

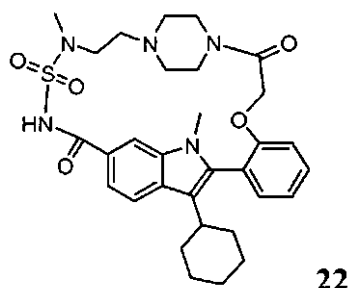
Etapa 5



Se añadió carbonildiimidazol (110 mg, 0,677 mmoles) a una disolución agitada de ácido 3-ciclohexil-1-metil-2-{2-[2-  
 5 ({{5-[metil(sulfamoil)amino]pentil}amino)-2-oxoetoxi]fenil}-1*H*-indol-6-carboxílico **20** (330 mg, 0,554 mmoles) en  
 acetonitrilo seco (CH<sub>3</sub>CN) (25 ml). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 h, con lo cual  
 se observó la conversión completa. La RM se diluyó entonces con acetonitrilo (25 ml), y se añadió DBU (172 mg, 2  
 eq.). La mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó entonces a  
 vacío, y el residuo resultante se diluyó sucesivamente en diclorometano, se lavó dos veces con una disolución 2M  
 10 de HCl, y después con salmuera. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El  
 residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de acetato de etilo en diclorometano  
 para producir 220 mg (69%) del producto del título 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-10,19-dimetil-5,6,7,8,9,10-  
 hexahidro-2*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,11,4,10,12,19-benzoxatitetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **21**  
 como un polvo blanco; *m/z* = 567 (M+H)<sup>+</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,85 - 0,9 (m, 1H), 1,00 - 1,40 (m, 7H), 1,4 - 1,5 (m, 2H), 1,75 - 1,85 (m, 7H), 2,2 -  
 2,25 (m, 1H), 2,5 - 2,6 (m, 1H), 3,00 - 3,1 (m, 1H), 3,2 - 3,3 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,5 (s, 3H), 4,3 (d, J = 14 Hz, 1H),  
 4,6 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,5 (m, 1H), 6,9 (d, J = 7,84 Hz, 1H), 7,3 (dd, J = 8,1 y J = 7 Hz, 1 H), 7,4 (d, J = 7 Hz, 1H),  
 15 7,55 (dd, J = 8,1 y J = 7 Hz, 1H), 7,6 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,9 (d, J = 8 Hz, 1H), 8 (s, 1H).

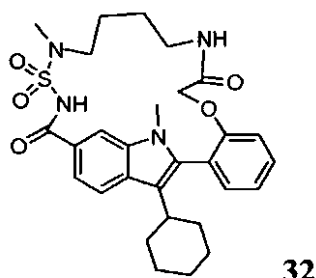
**Ejemplo 4: síntesis de 20,20-dióxido de 30-ciclohexil-12,21-dimetil-4-oxa-20-tia-1,12,19,21,24-  
 pentaazapentaciclo[22.2.2.1<sup>11,14</sup>.1<sup>13,17</sup>.0<sup>5,10</sup>]trianta-5,7,9,11(30),13(29),14,16-heptaeno-2,18-diona **22****

**22**

La síntesis del compuesto del título **22** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de 5 etapas dado a conocer para  
 20 la síntesis de compuesto **21**, usando *N*-metil-2-nitro-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)benzenosulfonamida en vez de *N*-(5-  
 aminopentil)-*N*-metil-2-nitrobenzenosulfonamida **16** en la primera etapa, y produciendo 33 mg de un sólido blanco;  
*m/z* 594 [M+H]<sup>+</sup>.

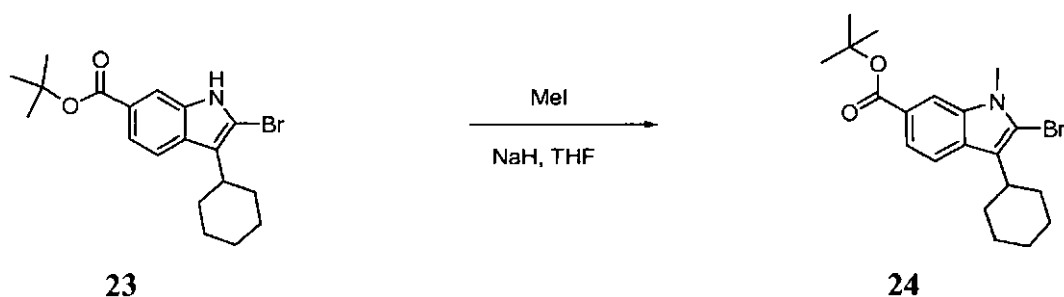
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,5 - 0,8 (m, 1H), 1,1 - 1,3 (m, 8H), 1,5 - 1,8 (m, 7H), 2,05-2,1 (m, 1H), 2,45 - 2,5  
 25 (m, 2H), 2,6 - 2,65 (m, 1H), 2,75-3,00 (m, 2 H), 2,95 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,48-3,5 (m, 1H), 3,95-4,00 (m, 1H), 4,4 (d,  
 J = 14 Hz, 1H), 4,75 (d, J = 14 Hz, 1H), 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,2 (dd, J = 7,4 y J = 7,3 Hz, 1H), 7,4 (d, J = 7,3 Hz,  
 1H), 7,5 (dd, J = 8,3 y J = 7,4 Hz, 1H), 7,6 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H).

**Ejemplo 5: síntesis de 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-9,18-dimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-  
 di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatitetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **32****

**32**

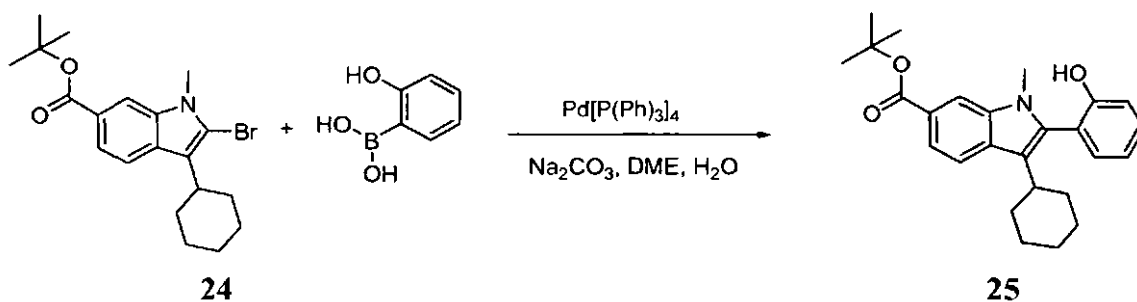
30 Etapa 1

La síntesis del material de partida (2-bromo-3-ciclohexil-6-tercbutilesterindol) **23** se describe en el documento  
 US2007270406A1



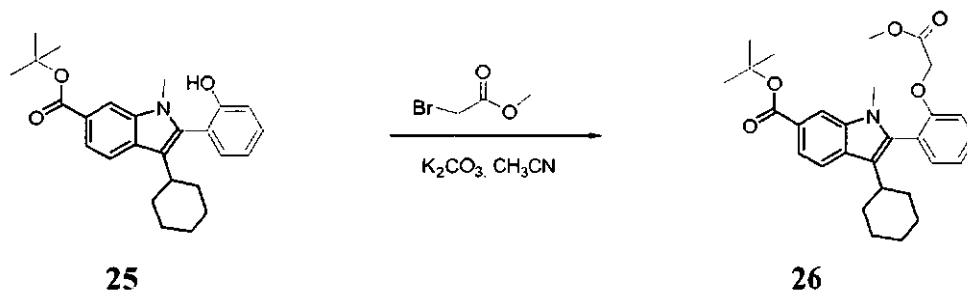
Se añadió NaH (400 mg, 15,86 mmoles) a una disolución del intermedio **23** (4 g, 10,57 mmoles) en THF seco. Después, se añadió yodometano (3 g, 21,15 mmoles) a temperatura ambiente. Tras 12 h, la mezcla de reacción se repartió entre agua (pH 6) y AcOEt. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y después se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente heptano/EtOAc 1:0 hasta 80:20) para producir 3,8 g (92%) de 2-bromo-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **24**:  $m/z = 393$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 2



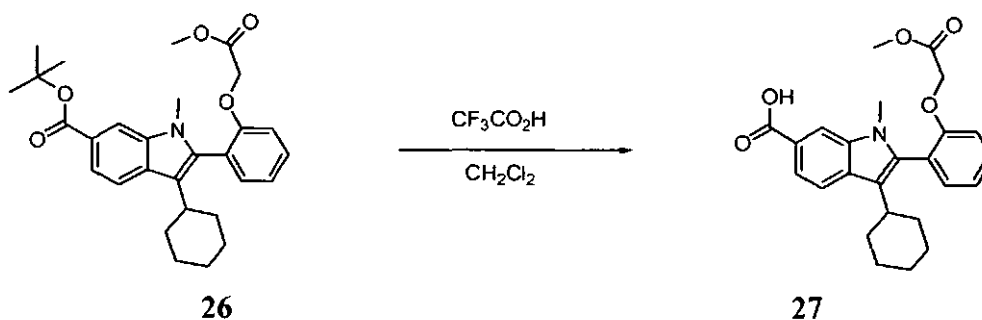
Una disolución de 2-bromo-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo (**24**, 500 mg, 1,27 mmoles), ácido 2-hidroxi-fenilborónico (211 mg, 1,53 mmoles) y carbonato de potasio (1,35 g, 12,74 mmoles) en 100 ml de 1,2-dimetoxietano/agua (4:1) se inundó a conciencia con argón. Después se añadió cloruro de *trans*-bis(trifenilfosfina)paladio(II) (0,147 g, 0,127 mmoles), y la reacción se calentó a 100°C bajo argón durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtraron. La disolución filtrada se concentró a vacío para dar 3-ciclohexil-2-(2-hidroxifenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **25**:  $m/z = 406$  (M+H)<sup>+</sup>.

etapa 3



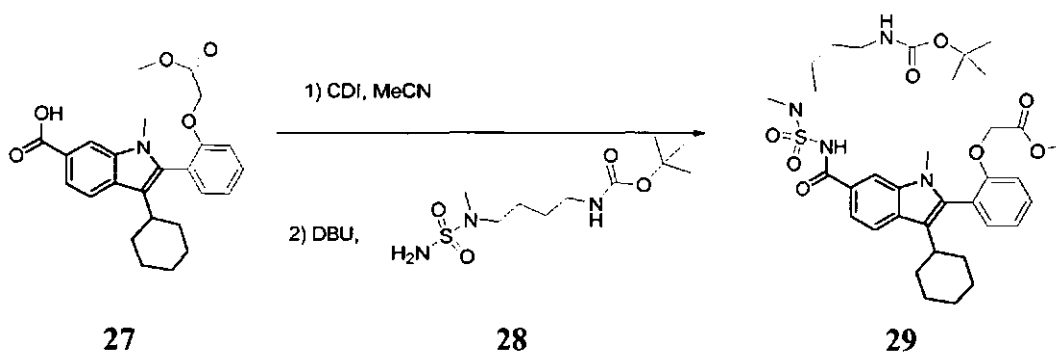
Una disolución del intermedio **25** (0,6 g, 1,5 mmoles), 2-bromoacetato de metilo (0,281 g, 1,83 mmoles) y carbonato de potasio (0,423 g, 3,06 mmoles) en 50 ml de MeCN se agitó a temperatura ambiente. Tras 12 h, la mezcla de reacción se concentró a vacío, y el residuo se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. La capa orgánica se secó y se evaporó a vacío para producir 0,7 g (96%) de 3-ciclohexil-2-[2-(2-metoxi-2-oxoetoxi)fenil]-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **26**:  $m/z = 478$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 4



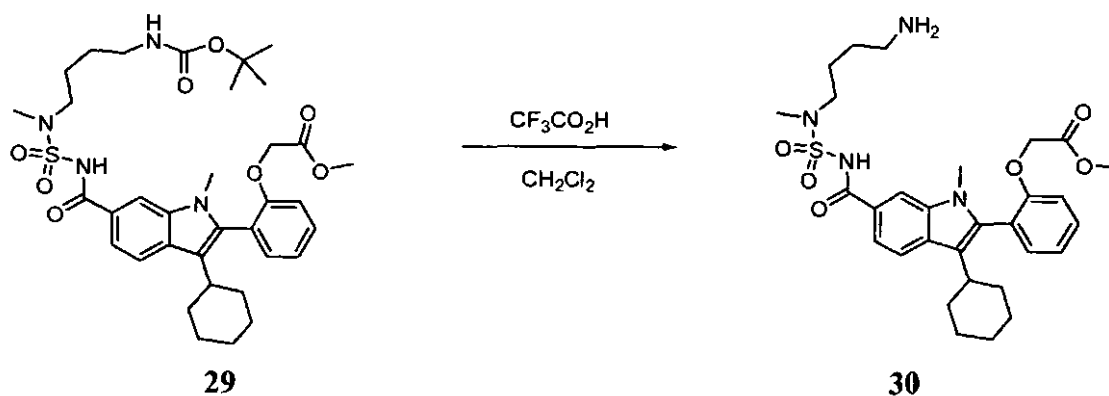
5 A una disolución de 3-ciclohexil-2-[2-(2-metoxi-2-oxoetoxi)fenil]-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **26** (0,7 g, 1,46 mmoles) en diclorometano se añadieron 50 ml de ácido trifluoro-acético (4,2 g, 36,6 mmoles). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó, después el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando diclorometano/metanol, para producir 0,59 g (96%) de ácido 3-ciclohexil-2-[2-(2-metoxi-2-oxoetoxi)fenil]-1-metil-1*H*-indol-6-carboxílico **27**:  $m/z = 422$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 5



10 Se añadió carbonildiimidazol (567 mg, 3,5 mmoles) a una disolución agitada del intermedio **27** (590 mg, 1,4 mmoles) en acetonitrilo seco (CH<sub>3</sub>CN) (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 h, con lo cual se observó la conversión completa. Se añadió el 4-(metil(sulfamoil)amino)butilcarbamato de *tert*-butilo **28** (394 mg, 1,4 mmoles) y DBU (426 mg, 2,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó toda la noche a la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó entonces a vacío, y el residuo resultante se disolvió sucesivamente en diclorometano, se lavó dos veces con una disolución 2M de HCl, y después con salmuera. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de acetato de etilo en diclorometano para producir 675 mg (70%) del [2-(6-[[4-[[*tert*-butoxicarbonil]amino]butil](metil)sulfamoil]carbamoil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-2-il)fenoxi]acetato de metilo **29** del título como un polvo blanco;  $m/z = 685$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 6



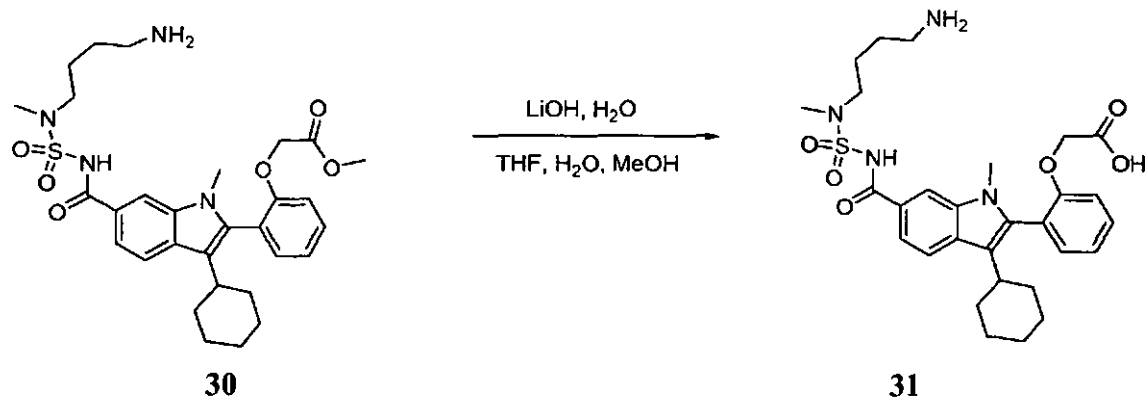
20

A una disolución del intermedio **29** (0,675 g, 1 mmoles) en diclorometano se añadieron 50 ml de ácido trifluoro-acético (2,86 g, 20 mmoles). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente



se eliminó, después el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando diclorometano/metanol para producir 0,55 g (95%) de [2-(6-[[[4-aminobutil](metil)sulfamoil]carbamoil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-2-il)fenoxi]acetato de metilo **30**:  $m/z = 585 (M+H)^+$ .

Etapa 7



5

10

A una disolución del intermedio **30** (550 mg, 0,941 mmoles) en THF y metanol (4/1) (50 ml) se añadió una disolución de hidróxido de litio (79 mg, 1,88 mmoles) en agua. La mezcla resultante se agitó a RT durante la noche. La mezcla se vertió entonces sucesivamente en agua, se acidificó hasta pH = 5 con HCl, se extrajo con diclorometano, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de metanol en DCM para dar 500 mg (93%) del producto del título ácido [2-(6-[[[4-aminobutil](metil)sulfamoil]carbamoil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-2-il)fenoxi]acético **31** como un sólido blanco;  $m/z = 571 (M+H)^+$ .

Etapa 8



15

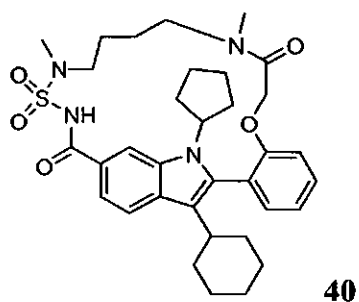
20

A una disolución de ácido 2-(2-(6-(*N*-(4-aminobutil)-*N*-metilsulfamoilcarbamoil)-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-2-il)fenoxi)acético **31** (40 mg, 0,07 mmoles) en 50 ml de THF se añadieron HATU (40 mg, 0,1 mmoles) y diisopropiletilamina (27 mg, 0,2 mmoles). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla de reacción se vertió sucesivamente en agua, se extrajo con diclorometano, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de metanol en DCM como eluyente, para dar 5 mg (rendimiento de 13%) del producto del título 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-9,18-dimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatietetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **32**;  $m/z = 553 (M+H)^+$ .

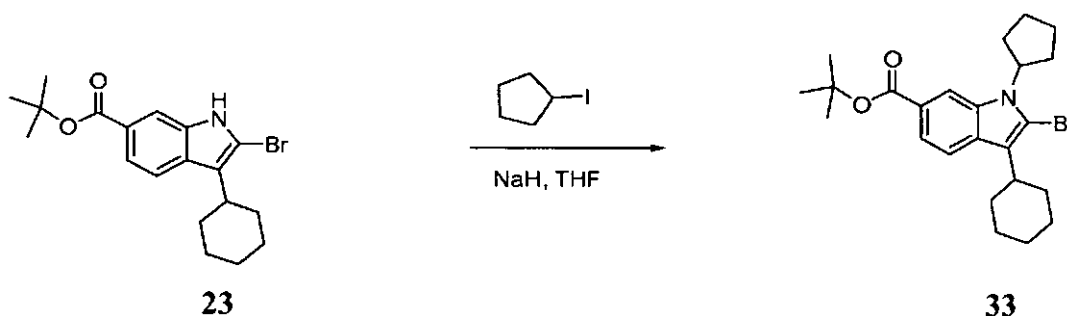
25

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,85 - 0,9 (m, 1H), 1,00 - 1,40 (m, 7H), 1,4 - 1,5 (m, 2H), 1,75 - 1,85 (m, 5H), 2,2 - 2,25 (m, 1H), 2,5 - 2,6 (m, 1H), 3,00 - 3,1 (m, 1H), 3,2 - 3,3 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,5 (s, 3H), 4,3 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,6 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,5 (m, 1H), 6,9 (d, J = 7,84 Hz, 1H), 7,3 (dd, J = 8,1 y J = 7 Hz, 1H), 7,4 (d, J = 7 Hz, 1H), 7,55 (dd, J = 8,1 y J = 7 Hz, 1H), 7,6 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,9 (d, J = 8 Hz, 1H), 8 (s, 1H).

**Ejemplo 6: síntesis de 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-18-ciclopentil-4,9-dimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatietetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **40****

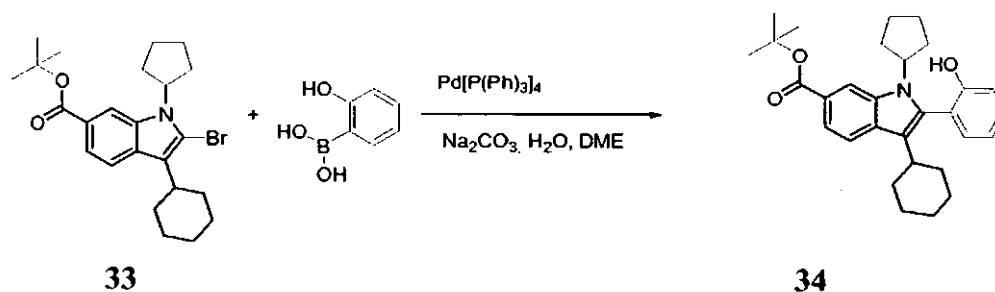


Etapa 1



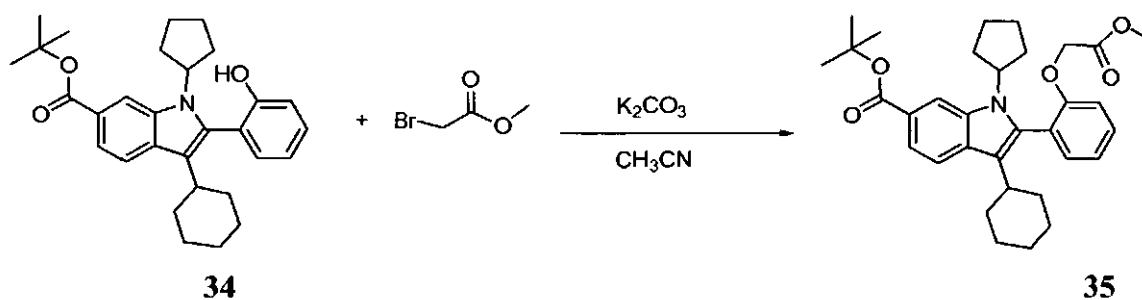
5 Para la preparación de **33** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **24**, usando **23** y yodociclopentano como material de partida, produciendo 500 mg (rendimiento de 15%) de 2-bromo-3-ciclohexil-1-ciclopentil-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **33**;  $m/z = 447$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 2



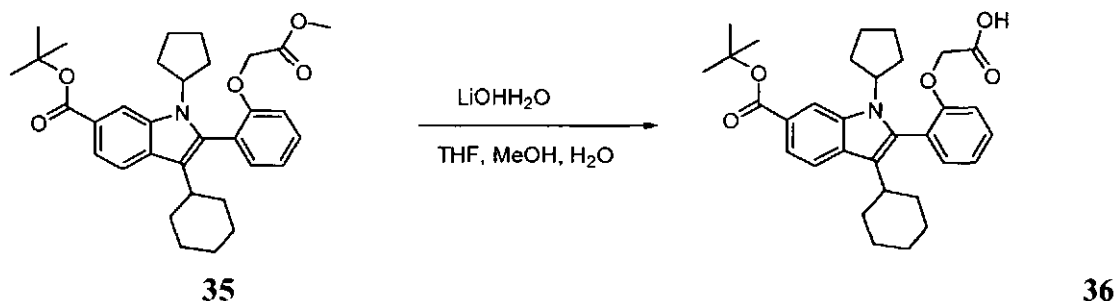
10 Para la preparación de **34** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **25**, usando intermedio **33** y ácido 2-hidroxi-fenilborónico como material de partida, produciendo 400 mg (rendimiento de 28%) de 3-ciclohexil-1-ciclopentil-2-(2-hidroxifenil)-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **34**;  $m/z = 460$  (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 3



Para la preparación de **35** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **26**, usando intermedio **34** y 2-bromoacetato de metilo como material de partida, produciendo 450 mg (rendimiento de 97%) de 3-ciclohexil-1-ciclopentil-2-[2-(2-metoxi-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **35**;  $m/z = 532$  (M+H)<sup>+</sup>.

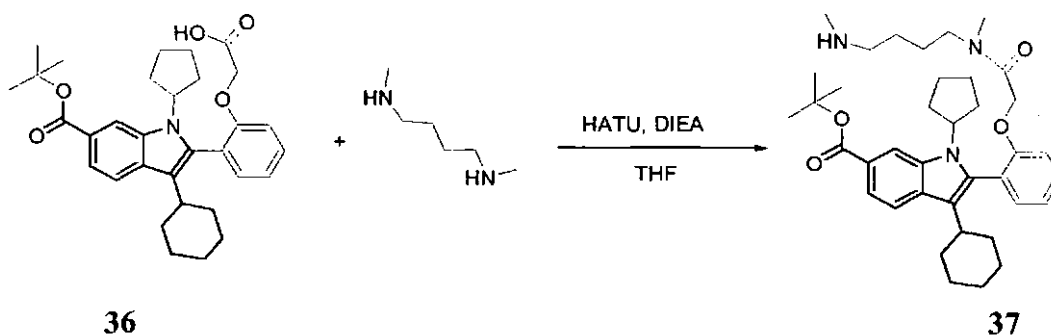
Etapa 4



5

Para la preparación de **36** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **31**, usando intermedio **35** como material de partida, produciendo 410 mg (rendimiento de 94%) de ácido {2-[6-(*tert*-butoxicarbonil)-3-ciclohexil-1-ciclopentil-1*H*-indol-2-il]fenoxi}acético **36**;  $m/z = 518$  (M+H)<sup>+</sup>

Etapa 5

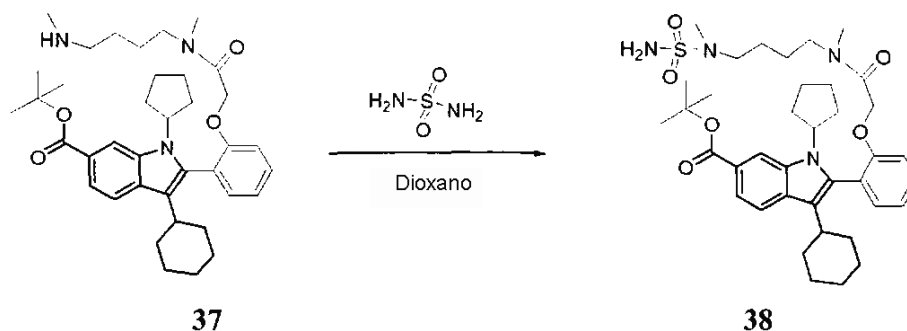


10

Para la preparación de **37** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **6**, usando intermedio **36** y *N,N'*-dimetilbutilendiamina como material de partida, produciendo 450 mg (rendimiento de 92%) de 3-ciclohexil-1-ciclopentil-2-[2-(2-(2-(metil[4-(metilamino)butil]amino)-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **37**;  $m/z = 617$  (M+H)<sup>+</sup>

15

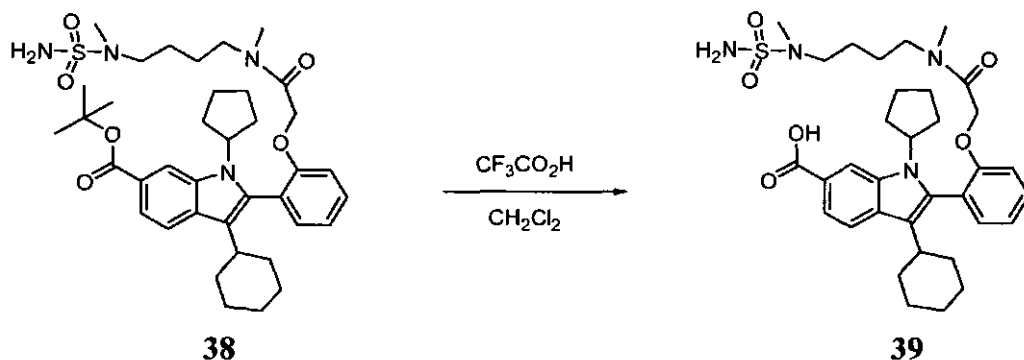
Etapa 6



Para la preparación de **38** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **19**, usando intermedio **37** como material de partida, produciendo 400 mg (rendimiento de 79%) de 3-ciclohexil-1-ciclopentil-2-[2-(2-(metil[4-(metil(sulfamoyl)amino)butil]amino)-2-oxoetoxi)fenil]-1*H*-indol-6-carboxilato de *tert*-butilo **38**;  $m/z = 695$  (M+H)<sup>+</sup>

20

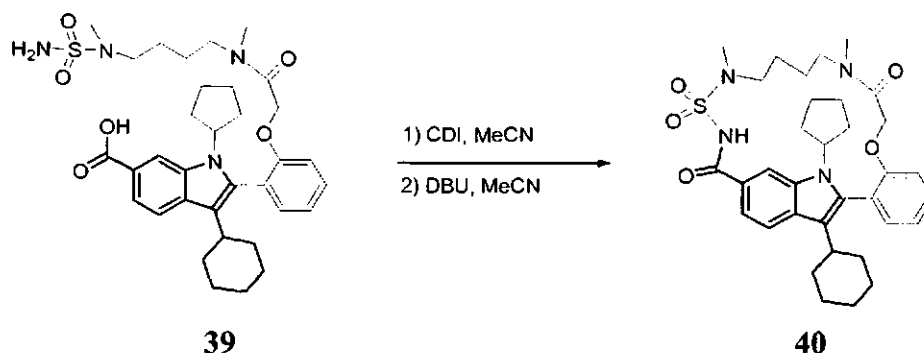
Etapa 7



Para la preparación de **39** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **27**, usando intermedio **38** como material de partida, produciendo 150 mg (rendimiento de 41%) de ácido 3-ciclohexil-1-ciclopentil-2-{2-[2-(metil{4-[metil(sulfamoil)amino]butil}amino)-2-oxoetoxil]fenil}-1*H*-indol-6-carboxílico **39**;  $m/z = 639$  (M+H)<sup>+</sup>

5

Etapa 8



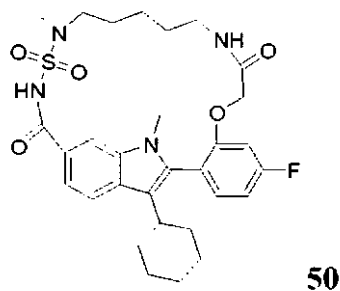
Para la preparación de **40** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **21**, usando intermedio **39** como material de partida, produciendo 30 mg (rendimiento de 21%) de 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-18-ciclopentil-4,9-dimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatietetraazaciclohenicosina-3,12(2*H*,11*H*,18*H*)-diona **40**;  $m/z = 621$  (M+H)<sup>+</sup>

10

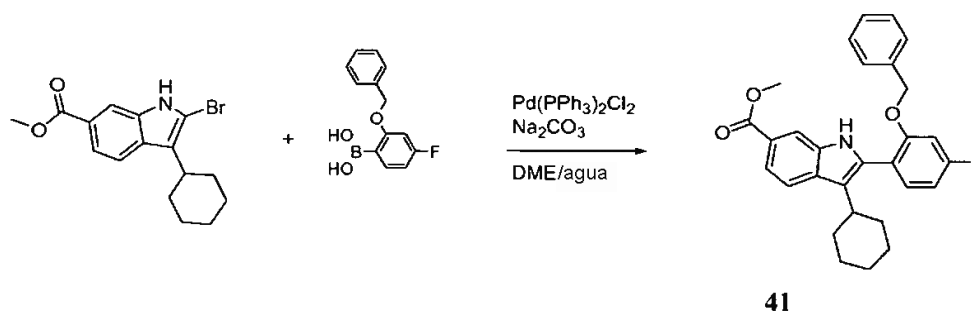
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,85 - 0,9 (m, 1H), 1,00 - 1,40 (m, 7H), 1,5 - 1,6 (m, 5H), 1,75 - 1,85 (m, 6H), 2- 2,3 (m, 6H), 2,35 - 2,5 (m, 2H), 2,6 (s, 3H), 2,9 (s, 3H), 3,25 - 3,35 (m, 1H), 3,9 - 3,95 (m, 1H), 4,2 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,4 (d, J = 14 Hz, 1H), 7 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,25 (dd, J = 8,1 y J = 7 Hz, 1H), 7,4 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,5 (dd, J = 7,9 y J = 7 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,9 (s, 1H).

15

**Ejemplo 7: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-23-fluoro-10,19-dimetil-5,6,7,8,9,10-hexahidro-2*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,11,4,10,12,19-benzoxatietetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **50****

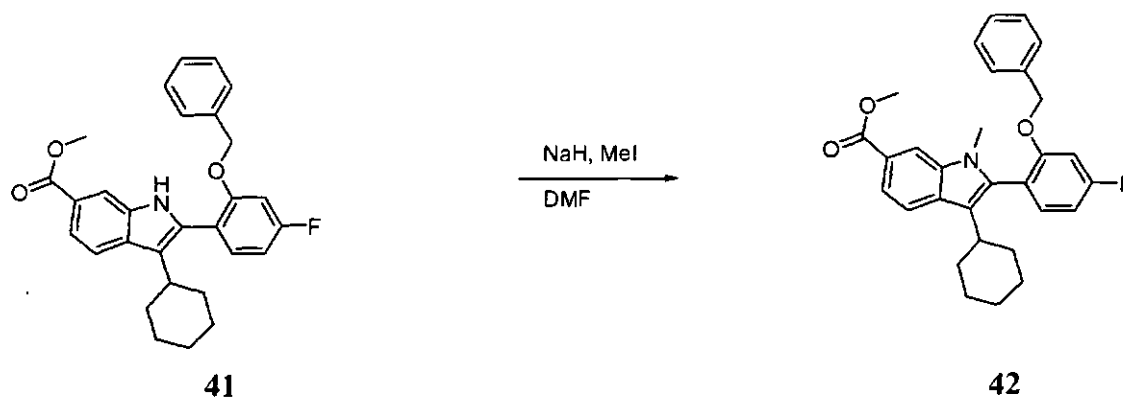


Etapa 1



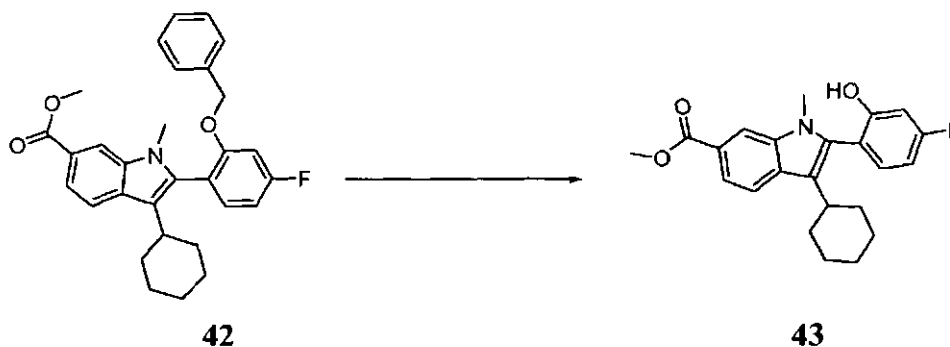
5 Para la preparación de **41** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **25**, usando 2-bromo-3-ciclohexil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **1** y ácido 2-(benciloxi)-4-fluorofenilborónico como material de partida, produciendo 14,9 mg (rendimiento de 87%) de 2-[2-(benciloxi)-4-fluorofenil]-3-ciclohexil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **41**;  $m/z = 458$  (M+H)<sup>+</sup>

Etapa 2



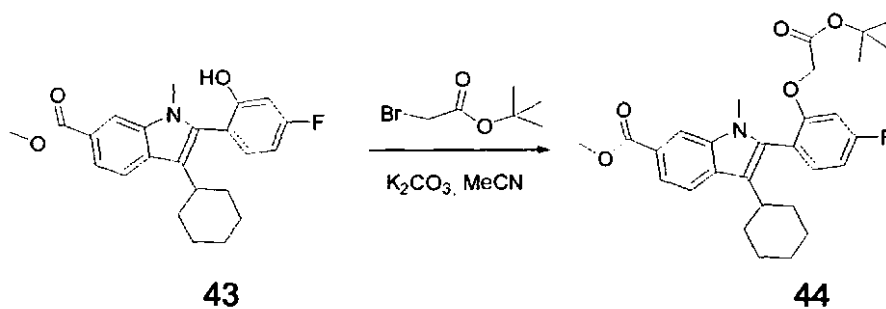
10 Para la preparación de **42** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **3**, usando intermedio **41** como material de partida, para dar 2-[2-(benciloxi)-4-fluorofenil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **42** con rendimiento cuantitativo:  $m/z = 472$  (M+H)<sup>+</sup>

Etapa 3



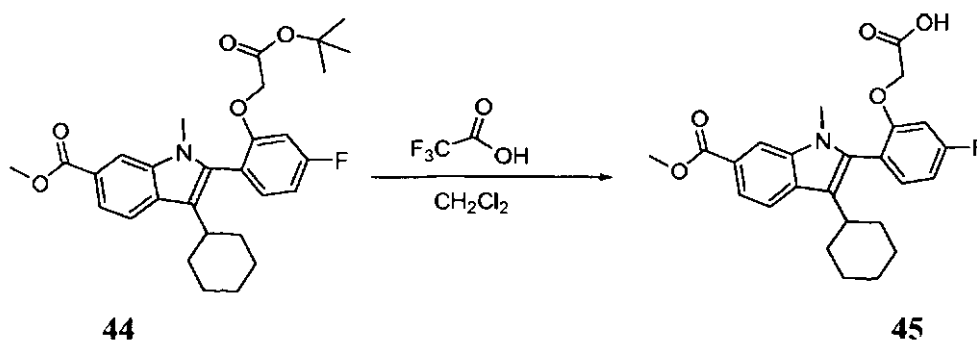
15 Para la preparación de **43** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **4**, usando intermedio **42** como material de partida, para dar 3-ciclohexil-2-(4-fluoro-2-hidroxifenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **43** con un rendimiento de 96%;  $m/z = 382$  (M+H)<sup>+</sup>

Etapa 4



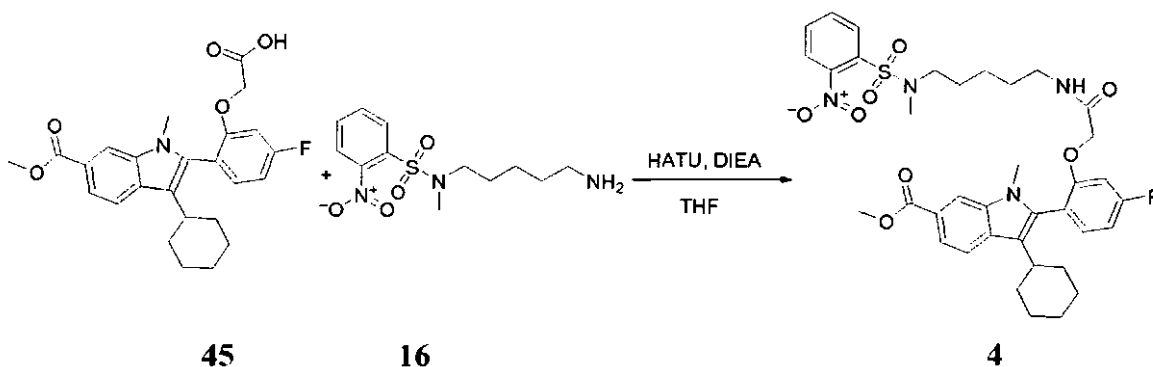
Para la preparación de **44** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **26**, usando intermedio **43** y 2-bromoacetato de *tert*-butilo como material de partida, para dar 2-[2-(2-*tert*-butoxi-2-oxoetoxi)-4-fluorofenil]-3-ciclohexil-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **44** con rendimiento cuantitativo;  $m/z = 496$  (M+H)<sup>+</sup>

5 Etapa 5



Para la preparación de **45** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **27**, usando intermedio **44** como material de partida, para dar ácido {2-[3-ciclohexil-6-(metoxicarbonil)-1-metil-1*H*-indol-2-il]-5-fluorofenoxi}acético **45** con rendimiento cuantitativo;  $m/z = 440$  (M+H)<sup>+</sup>

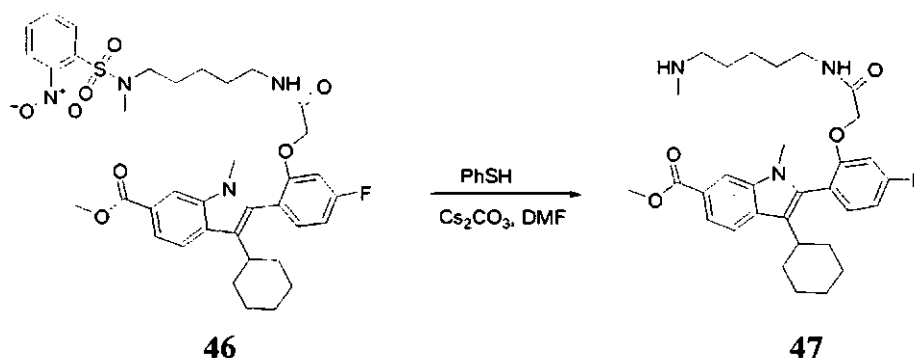
10 Etapa 6



Para la preparación de **46** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **17**, usando intermedio **45** y *N*-(5-aminopentil)-*N*-metil-2-nitrobenzenosulfonamida **16** como material de partida, produciendo 891 mg (rendimiento de 68%) de 3-ciclohexil-2-(4-fluoro-2-{2-[(5-{metil[(2-nitrofenil)sulfonyl]amino}pentil)amino]-2-oxoetoxi]fenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **46**;  $m/z = 723$  (M+H)<sup>+</sup>

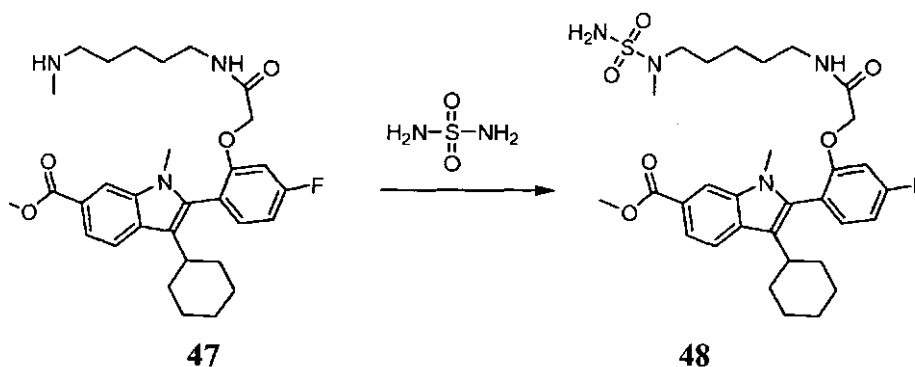
15

Etapa 7



Para la preparación de **47** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **18**, usando intermedio **46** como material de partida, para producir 520 mg (rendimiento de 78%) de 3-ciclohexil-2-[4-fluoro-2-(2-[[5-(metilamino)pentil]amino]-2-oxoetoxi)fenil]-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **47**;  $m/z = 538$  (M+H)<sup>+</sup>

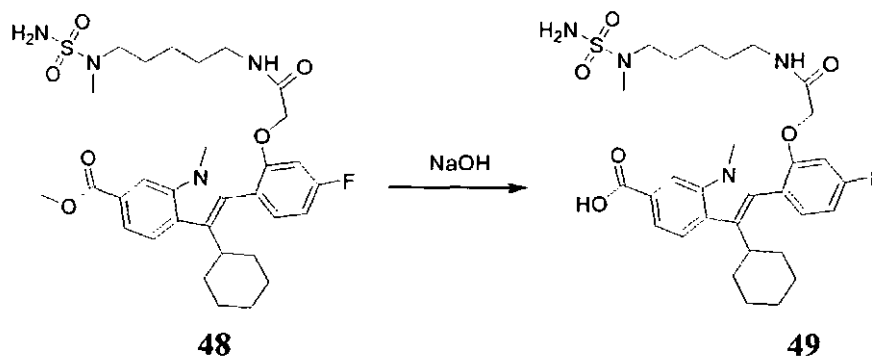
5 Etapa 8



Para la preparación de **48** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **19**, usando intermedio **47** como material de partida, para producir 590 mg (rendimiento de 98%) de 3-ciclohexil-2-(4-fluoro-2-[2-((5-[metil(sulfamoil)amino]pentil)amina)-2-oxoetoxi]fenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxilato de metilo **48**;  $m/z = 617$  (M+H)<sup>+</sup>

10

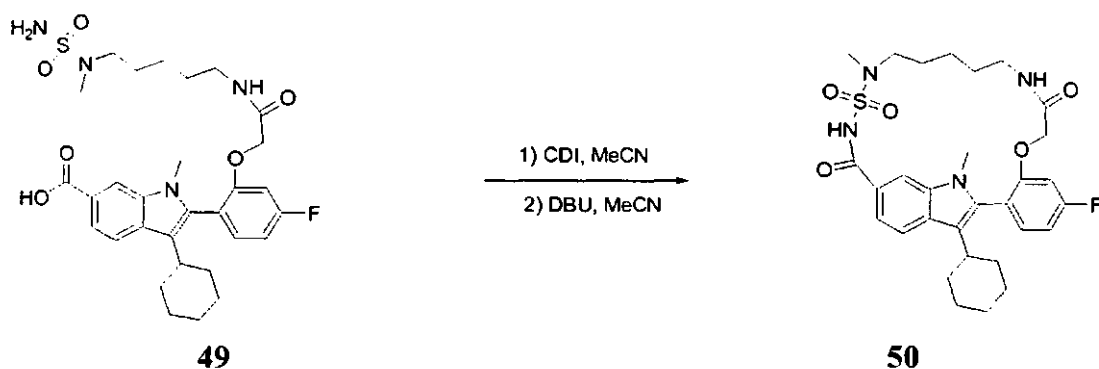
Etapa 9



Para la preparación de **49** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **8**, usando intermedio **48** como material de partida, para producir 399 mg (rendimiento de 67%) de ácido 3-ciclohexil-2-(4-fluoro-2-[2-((5-[metil(sulfamoil)amino]pentil)amina)-2-oxoetoxi]fenil)-1-metil-1*H*-indol-6-carboxílico **49**;  $m/z = 603$  (M+H)<sup>+</sup>

15

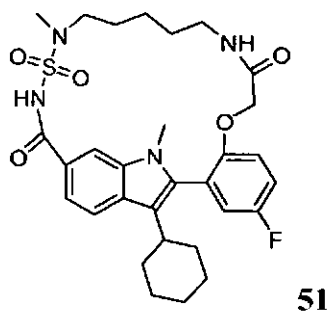
Etapa 10



Para la preparación de **50** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **21**, usando intermedio **49** como material de partida, para producir 220 mg (rendimiento de 57%) de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-23-fluoro-10,19-dimetil-5,6,7,8,9,10-hexahidro-2*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,11,4,10,12,19-benzoxatitetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **50**;  $m/z = 585$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 0,55 - 0,65 (m, 1H), 1,00 - 1,10 (m, 2H), 1,12 - 1,27 (m, 5H), 1,52 - 1,58 (m, 2H), 1,64 - 1,78 (m, 6H), 2,25 - 2,29 (m, 1H), 2,95 - 3,05 (m, 5H), 3,28 - 3,38 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 4,40 (d, J = 13,5 Hz, 1H), 4,49 (d, J = 13,7 Hz, 1H), 5,88 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 7,03 - 7,08 (m, 1H), 7,18 (d, J = 10,5 Hz, 1H), 7,42 - 7,47 (m, 1H), 7,62 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,39 (s, 1H), 11,62 (s, 1H).

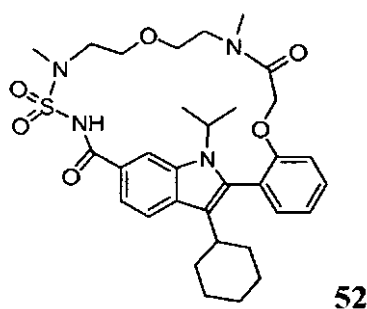
**Ejemplo 8: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-22-fluoro-10,19-dimetil-5,6,7,8,9,10-hexahidro-2*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,11,4,10,12,19-benzoxatitetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **51****



La síntesis del compuesto del título **51** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de 10 etapas dado a conocer para la síntesis de compuesto **50**, usando ácido 2-(benciloxi)-5-fluorofenilborónico en la primera etapa, y produjo 431 mg de un sólido blanco;  $m/z$  585 [M+H]<sup>+</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) δ ppm 0,64 - 0,72 (m, 1H), 0,96 - 1,01 (m, 2H), 1,09 - 1,13 (m, 1H), 1,18 - 1,32 (m, 3H), 1,40 - 1,47 (m, 1H), 1,59 (br s, 4H), 1,70 - 1,85 (m, 6H), 2,15 - 2,22 (m, 1H), 2,52 - 2,65 (m, 1H), 3,05 - 3,09 (m, 1H), 3,22 (s, 3H), 3,24 - 3,31 (m, 1H), 3,53 (s, 3H), 4,33 (d, J = 12,5 Hz, 1H), 4,41 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,36 - 5,40 (m, 1H), 6,94 (dd, J = 8,1 y J = 3,4 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,93 (br s, 1H).

**Ejemplo 9: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-4,10-dimetil-19-(1-metiletil)-5,6,9,10-tetrahidro-2*H*,8*H*-14,18:17,20-di(meteno)-1,7,11,4,10,12,19-benzodioxatitetraazaciclodocosina-3,13(4*H*,12*H*,19*H*)-diona **52****

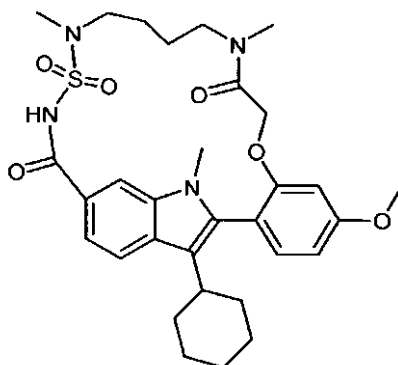




La síntesis del compuesto del título **52** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de 8 etapas dado a conocer para la síntesis de compuesto **40**, usando 2-yodopropano en la primera etapa y N-metil-2-(metilaminoetiloxi)etilamina en la etapa 5, produciendo 300 mg de un sólido blanco;  $m/z$  611 [M+H]<sup>+</sup>.

5 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,1-1,2 (m, 4H), 1,6 - 1,75 (m, 11H), 2,2 (s, 3H), 2,25 - 2,3 (m, 2H), 2,4-2,5 (m, 1H), 3,00 - 3,1 (m, 2H), 3,2 (s, 3H), 3,3-3,35 (m, 1H), 3,4-3,48 (m, 2H), 3,5-3,55 (m, 1H), 4,1-4,25 (m, 2H), 4,35-4,5 (m, 2H), 6,88 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,25 (dd, J = 8,2 y J = 7,5 Hz, 1H), 7,35-7,4 (m, 2H), 7,5 (dd, J = 8,1 y J = 7,5 Hz, 1H), 7,8 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,5 (br. s, 1H).

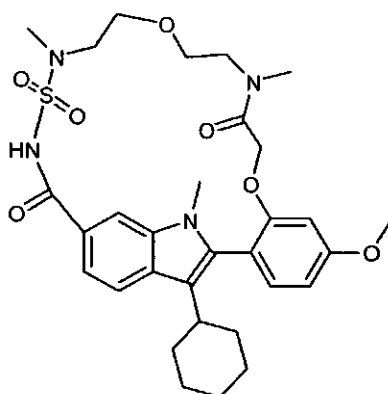
**Ejemplo 10: síntesis de 10,10-dióxido de 24-ciclohexil-22-metoxi-4,9,18-trimetil-4,5,6,7,8,9-hexahidro-13,17:16,19-di(meteno)-1,10,4,9,11,18-benzoxatitetraazaciclohenicosina-3,12(2H,11H,18H)-diona 53**

**53**

La síntesis del compuesto del título **53** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de 9 etapas dado a conocer para la síntesis de compuesto **10**, usando ácido 2-(benciloxi)-4-metoxifenilborónico en la primera etapa y N,N-dimetilbutilendiamina en etapa 5, produciendo 57 mg de un sólido blanco;  $m/z$  597 [M+H]<sup>+</sup>.

15 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,04 - 1,08 (m, 1H), 1,20 - 1,36 (m, 4H), 1,37 - 1,46 (m, 4H), 1,69 (s, 3H), 1,73 - 1,76 (m, 2H), 1,78 - 1,98 (m, 4H), 2,06 - 2,15 (m, 1H), 2,65 - 2,71 (m, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,25 - 3,30 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,72 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,92 - 4,01 (m, 1H), 4,07 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 6,80 (dd, J = 8,5 y 2,4 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,85 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,36 (br s, 1H).

20 **Ejemplo 11: síntesis de 11,11-dióxido de 25-ciclohexil-23-metoxi-4,10,19-trimetil-5,6,9,10-tetrahidro-2H,8H-14,18:17,20-di(meteno)-1,7,11,4,10,12,19-benzodioxatitetraazaciclodocosina-3,13(4H,12H,19H)-diona 54**

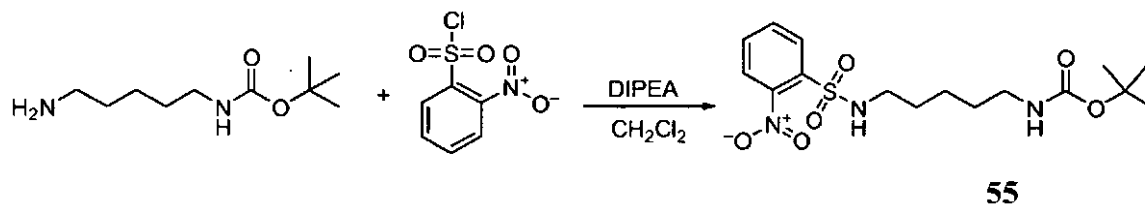
**54**

La síntesis del compuesto del título **54** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de 9 etapas dado a conocer para la síntesis de compuesto **10**, usando ácido 2-(benciloxi)-4-metoxifenilborónico en la primera etapa, produciendo 9 mg de un sólido blanco;  $m/z$  613 [M+H]<sup>+</sup>.

30 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,15 - 1,38 (m, 4H), 1,70 - 1,75 (m, 2H), 1,78 - 1,90 (m, 4H), 2,17 (s, 3H), 2,30 - 2,38 (m, 1H), 2,45 - 2,51 (m, 1H), 2,52 - 2,63 (m, 1H), 3,02 - 3,09 (m, 1H), 3,22 (s, 3H), 3,26 - 3,33 (m, 1H), 3,47 (s, 3H), 3,52 - 3,56 (m, 2H), 3,70 - 3,78 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 4,07 - 4,15 (m, 1H), 4,41 (s, 2H), 6,51 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 6,72 (dd, J = 8,2 y J = 2,2 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,82 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,75 (br s, 1H).

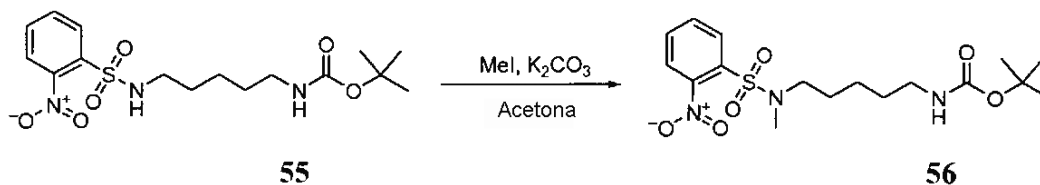
**Ejemplo 12: Síntesis de N-(5-aminopentil)-N-metil-2-nitrobenenosulfonamida 16**

## Etapa 1



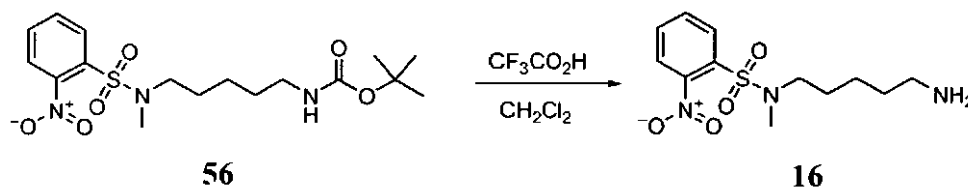
5 A una disolución enfriada de (5-aminopentil)carbamato de *tert*-butilo (20 g, 99 mmoles) en diclorometano se añadieron 250 ml de cloruro de 2-nitrobenzo-1-sulfonyl (23 g, 104 mmoles). La mezcla resultante se agitó a 0°C, y después se añadió gota a gota diisopropiletilamina (19,7 g, 144 mmoles). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se vertió en agua y ácido cítrico, la capa orgánica se separó y se secó sucesivamente sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró para producir 32,6 g (85%) de 5-[[[2-nitrofenil]sulfonyl]amino]pentil]carbamato de *tert*-butilo **55** como agujas blancas *m/z* 388 [M+H]<sup>+</sup>.

## Etapa 2



10 A una disolución de 5-[[[2-nitrofenil]sulfonyl]amino]pentil]carbamato de *tert*-butilo **55** (32,6 g, 84 mmoles) en acetona (300 ml) se añadió carbonato de potasio (23,2 g, 168 mmoles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se añadió gota a gota yoduro de metilo (17,88 g, 126 mmoles). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se vertió en agua, y se añadió diclorometano. La capa orgánica se separó y se secó sucesivamente sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El residuo se trituró con éter diisopropílico para producir 31,6 g, 93% de 5-[[[2-nitrofenil]sulfonyl]amino]pentil]carbamato de *tert*-butilo **56** como un polvo blanco *m/z* 402 [M+H]<sup>+</sup>.

## Etapa 3



20 Para la preparación de **16** se usó el mismo procedimiento que para la preparación del compuesto **27**, usando intermedio **56** como material de partida, para proporcionar *N*-(5-aminopentil)-*N*-metil-2-nitrobenzenosulfonamida **16** con rendimiento cuantitativo; *m/z* = 302 (M+H)<sup>+</sup>

**Ejemplo 13 – Actividad de los compuestos de fórmula (I)**

## Ensayo celular

25 Los compuestos de fórmula (I) se examinaron en busca de la actividad en la inhibición de la replicación del ARN de VHC en (a) un ensayo o ensayos celulares. El ensayo demostró que los compuestos de fórmula (I) inhibieron una estirpe replicante celular funcional de VHC, también conocida como replicones de VHC. El ensayo celular estaba basado en un constructo de expresión bicistrónico, como se describe por Lohmann et al. (1999) Science vol. 285 p. 110-113 con las modificaciones descritas por Krieger et al. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, en una estrategia de cribado multidiana. Se describen aquí dos ensayos celulares de VHC: el ensayo de replicón (para el cual el resultado se expresa como EC<sub>50</sub>) y el ensayo de replicón transitorio (para el cual el resultado se expresa como EC<sub>50</sub>-T).

## Ensayo de replicones

35 El ensayo utilizó la estirpe celular Huh-7 luc/neo transfectada de manera estable (a la que se hace referencia en lo sucesivo como Huh-Luc). Esta estirpe celular alberga un ARN que codifica un constructo de expresión bicistrónico que comprende las regiones de tipo salvaje NS3-NS5B del VHC tipo 1b traducidas desde un Sitio de Entrada de

Ribosoma Interno (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), precedidas por una porción informadora (FfL-luciferasa), y una porción marcadora seleccionable (neo<sup>R</sup>, neomicina-fosfotransferasa). El constructo está limitado por NTRs (regiones no traducidas) 5' y 3' del VHC tipo 1b. El cultivo continuado de las células de los replicones en presencia de G418 (neo<sup>R</sup>) depende de la replicación del ARN de VHC. Las células de los replicones transfectadas establemente que expresan ARN de VHC, que se replica autónomamente y a niveles altos, que codifica *inter alia* luciferasa, se usan para cribar los compuestos antivirales.

Las células de los replicones se colocaron en placas de 384 pocillos en presencia de los compuestos de ensayo y de control que se añadieron en diversas concentraciones. Después de una incubación de tres días, la replicación del VHC se midió por ensayo de la actividad de luciferasa (usando sustratos y reactivos estándar de ensayo de luciferasa, y un procesador de imágenes de microplacas Perkin Elmer ViewLux™ ultraHTS). Las células de los replicones en los cultivos de control tienen alta expresión de luciferasa en ausencia de cualquier inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto se monitorizó en las células Huh-Luc, haciendo posible que se generara una curva de dosis frente a respuesta para cada compuesto de ensayo. Después se calcularon los valores de EC<sub>50</sub>, valor que representa la cantidad del compuesto requerida para reducir en un 50% el nivel de actividad de luciferasa detectado, o más específicamente, la capacidad del ARN de replicones de VHC enlazado genéticamente para replicarse.

#### Ensayo de replicones transitorios

El ensayo utiliza un constructo de expresión bicistrónico que comprende las regiones NS3-NS5B de tipo salvaje del VHC tipo 1b (con1b) con mutaciones adaptables al cultivo celular del clon ET (E1202G, T1280I, K1846T) traducidas a partir de un sitio de entrada interna del ribosoma (IRES) derivado del virus de encefalomiocarditis (EMCV), precedido por una porción informadora (FfL-luciferasa) manejado por el IRES del virus de la Polio. El constructo está flanqueado por nitrógenos (regiones no traducidas) en 5' y 3' del VHC tipo 1b. Se genera ARN a partir de este constructo, y se transfecta en células Huh7 cure (Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. J. Virol. 2007; 81 (2): 588-598). El ARN del VHC transfectado se replica de forma autónoma, transitoriamente y a altos niveles, codificando *inter alia* luciferasa, y se usan para el ensayo de los compuestos antivirales.

Diseño del vector lanzadera. El casete del vector diseñado para NS5B lanzadera se generó a partir del plásmido pFKi341 Luc\_NS3-3'-ET (20). El replicón derivado de este plásmido consiste en la secuencia de NS3 hasta 3'-UTR de la cepa Con1 del genotipo 1b del VHC, y posee dos mutaciones adaptables al cultivo celular en NS3 (E1202G y T1280I) y una en NS4B (K1846T). Se generaron dos sitios de restricción AflII con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange de Stratagene (La Jolla, CA) usando el plásmido pFKi341 Luc\_NS3-3'-ET, el primero en el 3'NCR directamente después del codón de parada de NS5B, y el segundo 8 aminoácidos en dirección 5' del sitio de escisión de NS5A/NS5B. Debido a que se encontró que el sitio Scal necesario para la linealización del plásmido antes de la transcripción *in vitro* estaba presente en la secuencia de polimerasa de algunos aislados clínicos, se mutó a XbaI. El sitio XbaI endógeno del gen de luciferasa de la luciérnaga se eliminó mediante introducción de una mutación silenciosa.

Construcción de replicones quiméricos de NS5B. El ADNc que codifica el término C de NS5A (restos 440-447) y la longitud completa de NS5B (restos 1-591) se amplificó a partir de aislados clínicos usando cebadores específicos del subtipo con una parte 5' (16 nucleótidos) complementaria al vector lanzadera, y una parte 3' (13-19 nucleótidos) diseñada para ser complementaria a secuencias de aislados clínicos. Los amplicones se clonaron en el vector lanzadera de NS5B usando el método de clonación In-Fusion (In-Fusion Dry Down PCR Cloning Kit, Clontech). Los clones individuales o conjuntos de todos los clones obtenidos tras la transformación se usaron para la transcripción *in vitro* y se ensayaron en el ensayo de replicón transitorio. Se generaron datos para los compuestos de la presente invención usando dos replicones quiméricos procedentes de dos aislados clínicos del VHC genotipo 1a, 1a\_H77 y 1a\_6 (número de acceso de Genbank AF011751 y EF523592 resp.).

Ensayo de replicón transitorio. Se transfectaron diez microgramos de ARN de replicón lineal transcrito *in vitro* en células Huh7-cure, y se cuantificó la replicación del replicón tras 48 h de incubación (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) midiendo la luminiscencia tras la adición del sustrato de luciferasa (Steady Lite Plus; Perkin Elmer). La actividad de los compuestos frente a estos replicones, es decir, actividad inhibidora, se midió en una serie de diluciones de nueve puntos que permite que se genere una curva de respuesta frente a la dosis para cada compuesto de ensayo. Entonces se calcularon los valores de EC<sub>50</sub>, valor el cual representa la cantidad del compuesto requerida para disminuir en un 50% el nivel de actividad de luciferasa detectada, o más específicamente, la capacidad del ARN del replicón del VHC relacionado genéticamente para replicarse. Los valores de EC<sub>50</sub> resultantes medidos se dan en la Tabla 1. Se obtuvieron EC<sub>50</sub>-T Con1b con el replicón de tipo salvaje del genotipo 1b, EC<sub>50</sub>-T C11 y EC<sub>50</sub>-T C12 se obtuvieron con los replicones quiméricos de aislados clínicos 1a\_H77 y 1a\_6, respectivamente.

#### Ensayo de inhibición enzimática

##### a) Clonación, expresión y purificación de NS5B

La secuencia codificante para NS5B (cepa ConI de consenso del genotipo 1b) que carece de 21 restos C-terminales se amplificó a partir del plásmido pFKI389/ns3-3' (número de acceso de Genbank AJ242654), del plásmido pCV-H77C (número de acceso de Genbank AF 011751.1), y se subclonó en el plásmido pET21b como se describe previamente (Pauwels et al. J. Virol., 2007). Los constructos de expresión NS5BAC21 se transformaron en *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen, Madison, WI). Se inocularon cien mililitros de medio LB suplementado con carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) con una colonia, se hizo crecer toda la noche, y se transfirió a medio LB reciente suplementado con 3% de etanol, carbenicilina y cloranfenicol, a una relación de 1:200. Las células se hicieron crecer hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6, después de lo cual los cultivos de expresión se desplazaron hasta una temperatura de crecimiento de 20°C tras la inducción con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 0,4 mM y 10 µM, respectivamente. Después de 18 h de inducción, las células se cosecharon mediante centrifugación y se resuspendieron en 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 300 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1% de NP40, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de DTT suplementado con Inhibidor de Proteasa Completo libre de EDTA (Roche, Basel, Suiza). Las suspensiones celulares se destruyeron por ultrasonidos y se incubaron con 10-15 mg/l de DNase I (Roche, Basel, Suiza) durante 30 min. El desecho celular se eliminó mediante ultracentrifugación a 30.000x g durante 1 hora, y el lisado celular aclarado se congeló de forma ultrarrápida y se almacenó a -80°C antes de la purificación.

El lisado celular aclarado se descongeló y se cargó subsiguientemente en una columna HisTrap FF preempaquetada de 5 ml equilibrada con 25 mM de HEPES, pH 7,5, 500 mM de NaCl, 10% de glicerol y 5 mM de DTT. Las proteínas se eluyeron con 500 mM de imidazol a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contienen la proteína de interés se aplicaron en una columna de desalado HiPrep 26/10 preempaquetada equilibrada con 25 mM de HEPES, pH 7,5, 250 mM de NaCl, 10% de glicerol y 5 mM de DTT. Entonces, el pico de NS5B intercambiado con tampón se aplicó en una columna de 6 ml Resource S. La proteína se eluyó con un gradiente salino creciente, y se recogieron las fracciones. La pureza proteica se evaluó en geles premoledados de Nu-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de NS5B purificadas se concentraron usando concentradores Centri-Prep (Millipore, Billerica, MA, USA), y las concentraciones proteicas se determinaron mediante espectrofotometría con Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

b) Ensayo de ARN polimerasa dependiente de ARN

Se llevó a cabo la medición de la actividad de polimerización de NS5B de VHC evaluando la cantidad de GTP radiomarcado incorporado por la enzima en el ARN recientemente sintetizado usando un molde/cebador de ARN heteropolimérico. El ensayo de RdRp se llevó a cabo en placas de 384 pocillos. 2,5 nM de enzima NS5B purificada se preincubaron durante 10 min. con 150 nM de cebador oligo(rG<sub>13</sub>) biotinilado en 5', 15 nM de molde poli(rC), en 18 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20,5 mM de KCl, 17 mM de NaCl y 2,5 mM de DTT. Los compuestos de ensayo se añadieron entonces al complejo preformado de polimerasa-molde, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. antes de la adición de 600 nM de GTP, y 0,13 µCi de [<sup>3</sup>H]GTP. Se incubaron 30 µl de mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h antes de detener la reacción añadiendo 30 µl de perlas de SPA revestidas con estreptavidina (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) en EDTA 0,5 M. La reacción de 30 µl se terminó después de 2 horas a 25°C con la adición de 30 µl de perlas de SPA revestidas con estreptavidina (GE Healthcare, Uppsala, Suecia 5 mg/ml en 0,5 M EDTA). Tras la incubación a 25°C durante 30 min., la placa se contó usando un lector de microplacas Packard TopCount (30 s/pocillo, retraso de recuento de 1 min.), y se calcularon los valores de IC<sub>50</sub>. Los valores de IC<sub>50</sub> representan la concentración de compuesto requerida para disminuir en un 50% la cantidad de ARN producida, que se mide mediante la detección de GTP radiomarcado incorporado. Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos se dan en la Tabla 1.

La siguiente Tabla 1 lista compuestos según uno cualquiera de los ejemplos anteriores para los cuales se ha determinado la actividad según el ejemplo 3.

45

Tabla 1

Comp. nº	EC <sub>50</sub> -T Cl1 (µM)	EC <sub>50</sub> -T Cl2 (µM)	EC <sub>50</sub> -T ConIb (µM)	IC <sub>50</sub> a 5 n M (µM)
10	0,121	0,088	0,075	0,161
15	0,102	0,099	0,169	0,124
21	0,055	0,095	0,123	0,148
22	0,156	0,201	0,164	0,181
32	1,600	2,952	3,608	1,823
40	5,152	5,271	7,344	1,090
50	0,117	0,156	0,254	0,109

## ES 2 411 916 T3

Comp. n°	EC <sub>50</sub> -T Cl1 (μM)	EC <sub>50</sub> -T Cl2 (μM)	EC <sub>50</sub> -T ConIb (μM)	IC <sub>50</sub> a 5 n M (μM)
51				0,088
52	7,139	7,959	7,664	1,656
53	0,044	0,066	0,083	
54	0,067	0,081	0,103	

### Ensayo de unión enzimática

Los compuestos de fórmula (I) se examinaron para determinar su cinética de unión enzimática o afinidad usando un método a base de Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR), es decir, Biacore. Se cree que una baja disociación del compuesto inhibidor a partir de su diana viral (baja  $k_{off}$ , baja  $K_d$ ) reduce potencialmente el desarrollo de resistencia farmacéutica frente a fármacos antivirales (Dierynck et al. 2007. Journal of Virology, vol. 81, n° 24, 13845-13851). Todas las medidas se llevaron a cabo en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare). Las polimerasas NS5BΔC21 etiquetadas con HIS<sub>6</sub> purificadas se inmovilizaron usando captura no covalente a un chip sensor de NTA (GE Healthcare) en tampón de inmovilización (20 mM de MOPS pH 7,4, 500 mM de NaCl, 0,005% de Tween-P20, 1 mM de DTT, 50 μM de EDTA). Los estudios de interacción se llevaron a cabo todos a 25°C. Los inhibidores se diluyeron en serie en tampón de elución (20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 50 μM de EDTA, 1 mM de DTT, 0,005% de Tween-P20) que contiene 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se usó cinética de un solo ciclo, en la que se inyectaron 5 concentraciones crecientes de compuesto durante un período de 300 s cada uno en 1 único ciclo, y la disociación se monitorizó durante un período de 1200 s. La superficie del sensor se regeneró completamente entre los ciclos.

Los datos se analizaron usando análisis de regresión no lineal simultáneo (ajuste global) adaptado para cinética de un solo ciclo con software de evaluación Biacore T100 BiaEval 2.0 (GE Healthcare). Las constantes de velocidad individuales  $k_{on}$  y  $k_{off}$  y la constante de afinidad derivada,  $K_d = k_{off}/k_{on}$ , se determinaron mediante evaluación cinética de los sensogramas. Los modelos cinéticos dieron cuenta de los efectos de transporte másico bruto y limitado. Cada análisis se llevó a cabo al menos en dos experimentos independientes. La velocidad de disociación de una interacción cinética se puede traducir en un tiempo de permanencia del compuesto (semivida disociativa  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$ ) representativo del tiempo de interacción entre la polimerasa y su inhibidor.

Las constantes de velocidad de asociación ( $k_{on}$ ), las constantes de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ), la constante de afinidad derivada ( $K_d$ ) y la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) observadas, medidas para los compuestos de fórmula (I) o sus subgrupos en la enzima de tipo salvaje NS5B genotipos 1a, 1b y 4a se dan en la Tabla 2.

Tabla 2

Genotipo	Comp. n°	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (S)
1a	32	3,0E+03	8,9E-03	3,3E-06	78
	50	1,7E+05	6,7E-03	4,0E-08	103
	51	9,5E+04	3,5E-03	3,9E-08	198
4a	32	1,9E+04	8,7E-03	4,5E-07	80
	50	2,2E+05	2,0E-03	9,1E-09	343
	51	1,9E+05	2,2E-03	1,1E-08	320
1b	32	1,3E+04	1,5E-02	1,2E-06	47
	50	2,3E+04	6,0E-04	2,5E-08	1163
	51	2,0E+04	3,1E-04	1,6E-08	2243

### Ejemplo 14 – Composiciones farmacéuticas de compuestos de fórmula (I)

#### Formulación

Se disuelve ingrediente activo, *in casu* un compuesto de fórmula (I), en disolvente orgánico tal como etanol, metanol

o cloruro de metileno, preferiblemente una mezcla de etanol y cloruro de metileno. Los polímeros tales como copolímero de polivinilpirrolidona con acetato de vinilo (PVP-VA) o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), típicamente 5 mPa.s, se disuelven en disolventes orgánicos tales como etanol, metanol, y cloruro de metileno. Adecuadamente, el polímero se disuelve en etanol. Las disoluciones de polímero y de compuesto se mezclan y se secan subsiguientemente por pulverización. La relación de compuesto/polímero se selecciona de 1/1 a 1/6. Los intervalos intermedios fueron 1/1,5 y 1/3. Una relación adecuada fue 1/6. El polvo secado por pulverización, una dispersión sólida, se introduce subsiguientemente en cápsulas para la administración. La carga farmacéutica en una cápsula oscila entre 50 y 100 mg, dependiendo del tamaño de la cápsula usado.

Comprimidos revestidos con película

10 Preparación del núcleo del comprimido

Una mezcla de 100 g de ingrediente activo, *in casu* un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón se mezcla bien y después se humidifica con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en alrededor de 200 ml de agua. La mezcla de polvo húmedo se tamiza, se seca y se tamiza nuevamente. Después, se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. El conjunto se mezcla bien y se comprime en comprimidos, dando 10.000 comprimidos, comprendiendo cada uno 10 mg del ingrediente activo.

Revestimiento

A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Después se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol. Se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Esta última disolución se añade a la primera, y después se añaden 2,5 g de octanodecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada, y el conjunto se homogeneiza. Los núcleos del comprimido se revisten con la mezcla así obtenida en un aparato de revestimiento.

#### Ejemplo 15 – Análisis farmacocinético tras una única administración oral

25 A tres ratas macho Sprague-Dawley se les administró una dosis oral única de 10 mg/kg de los compuestos estudiados. Los compuestos se administraron mediante sonda nasogástrica como una disolución en PEG400/2% de vitamina E tocoferol succinato de polietilenglicol (vitamina E-TPGS).

30 Los animales se sacrificaron 7 horas después de la administración, y se recogieron muestras de plasma y de hígado. Las muestras se analizaron usando un método de investigación cualificado mediante LC-MS/MS para determinar la concentración del compuesto en el hígado y la relación de hígado a plasma a las 7 h después de la dosificación. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3. Se encontró que las concentraciones hepáticas de las ratas Sprague-Dawley 7 horas después de la dosificación oral de los compuestos estudiados fueron elevadas, y que los compuestos estudiados mostraron una relación muy elevada de hígado a plasma.

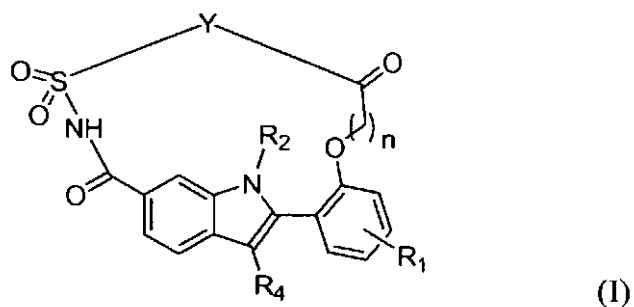
Tabla 3

Comp. nº.	Concentración hepática	Relación hígado/plasma
10	1717 ng/g	64
15	1524 ng/g	99

35

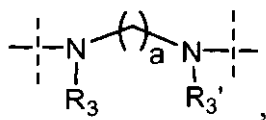
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

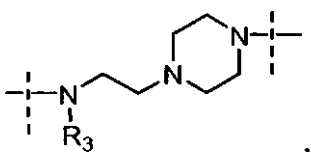
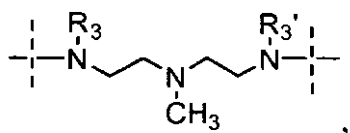
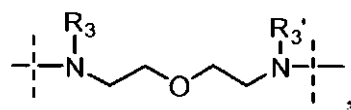
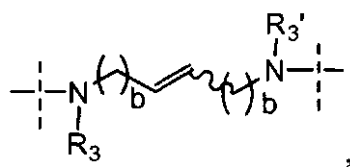


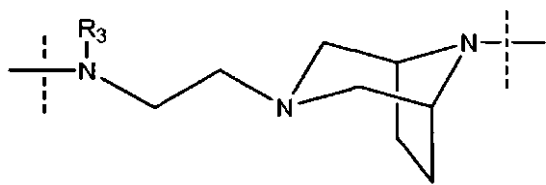
incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, hidratos, y solvatos de los mismos, en la que:

- 5
- R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, halo y alcoxi de C<sub>1-4</sub>;
  - R<sub>2</sub> se selecciona de alquilo de C<sub>1-4</sub> y cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>;
  - R<sub>4</sub> es cicloalquilo de C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido con halo;
  - n es 1 ó 2;
  - Y se selecciona de

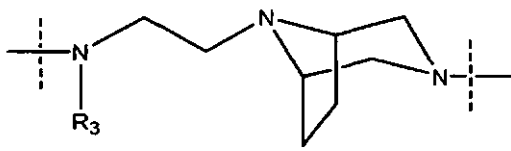


10



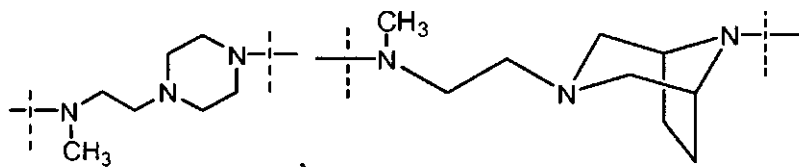
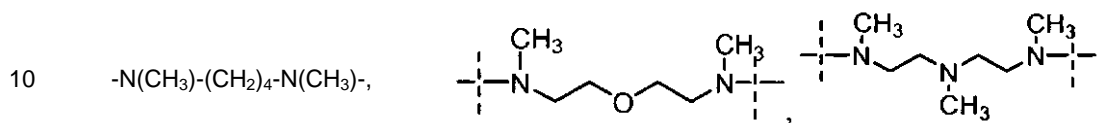


y

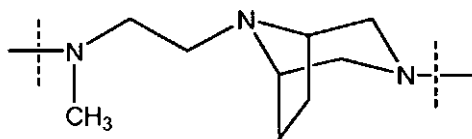


- a es 2, 3, 4 ó 5;
- 5 - cada b es independientemente 1 ó 2;
- R<sub>3</sub> y R<sub>3</sub>' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo de C<sub>1-6</sub> y cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que Y se selecciona de

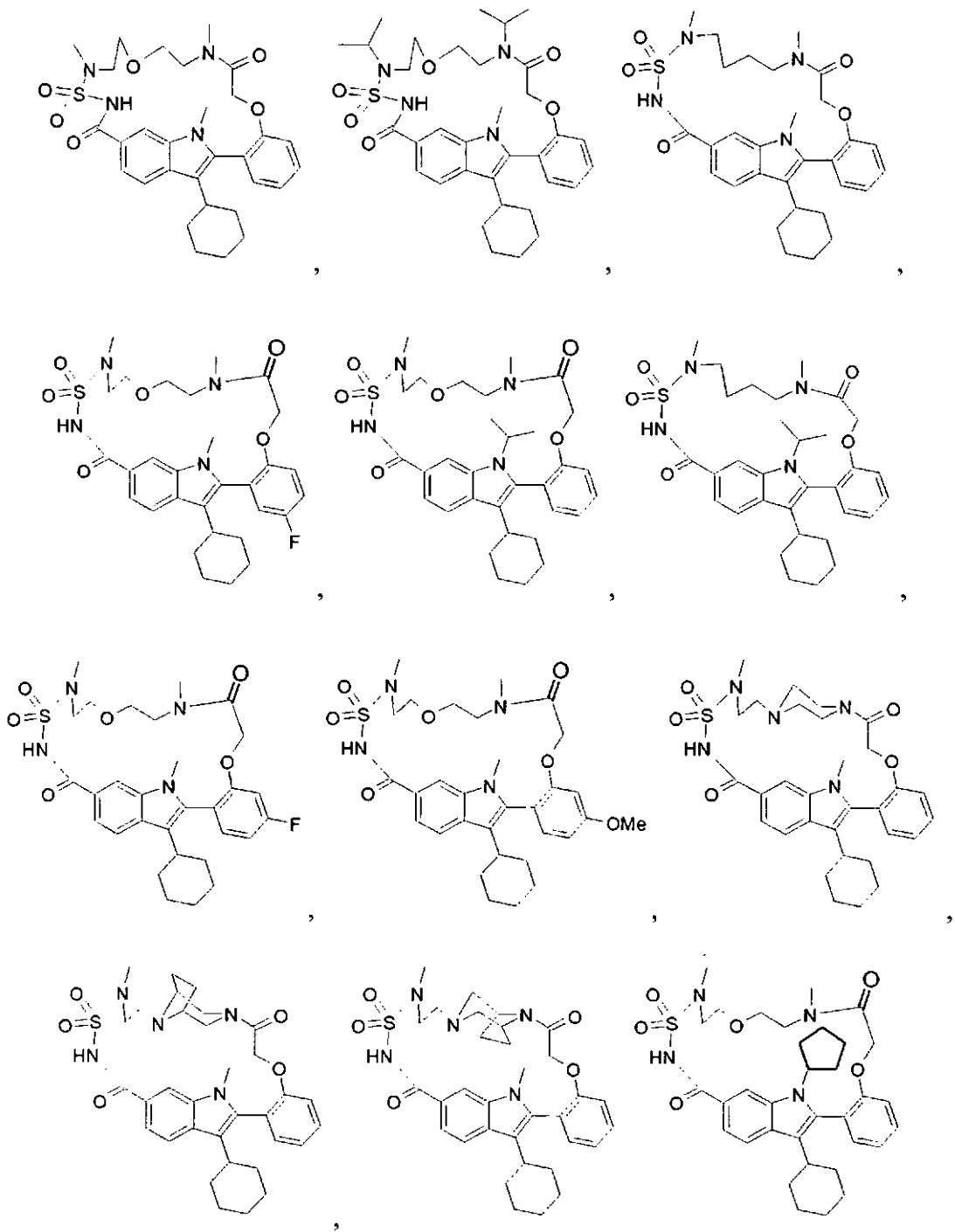


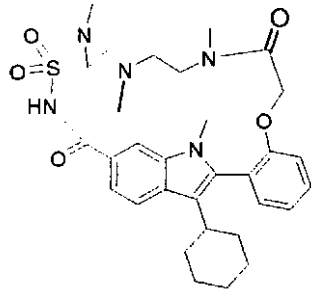
y



- 15 3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxi o fluoro.
- 4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sub>2</sub> se selecciona de metilo, etilo, isopropilo y ciclopropilo.
- 5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R<sub>4</sub> se selecciona de ciclohexilo y 2-fluorociclohexilo.
- 20 6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que n es 1.
- 7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de







incluyendo formas estereoquímicamente isómeras, y sales, solvatos o hidratos del mismo.

8. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo, y, como ingrediente activo, una cantidad antiviralmente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 5 9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además al menos algún otro compuesto anti-VHC.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 o reivindicación 9, que comprende además al menos un compuesto anti-VIH.
- 10 11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para uso como un medicamento.
12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para inhibir la replicación del VHC.
13. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación del VHC.