

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 536**

51 Int. Cl.:

C07K 5/08 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09774784 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2364321**

54 Título: **Inhibidores del VHC**

30 Prioridad:

04.12.2008 US 119859 P

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

19.07.2013

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543-4000 , US**

72 Inventor/es:

**HIEBERT, SHELDON y
SCOLA, PAUL MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 414 536 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores del VHC

La presente divulgación se refiere, en general, a compuestos antivíricos y, más específicamente se refiere a compuestos que inhiben la función de la proteasa NS3 (también denominada en el presente documento como "serina proteasa") codificada por el virus de la hepatitis C (VHC), a composiciones que comprenden dichos compuestos y a dichos compuestos para su uso en la inhibición de la función de la proteasa NS3.

El VHC es un importante patógeno humano, que se estima ha infectado a 170 millones de personas en todo el mundo – aproximadamente cinco veces el número de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humano de tipo 1. Una fracción sustancial de estos individuos infectados por el VHC desarrolla enfermedad hepática progresiva grave, que incluye cirrosis y carcinoma hepatocelular.

En la actualidad, la terapia más eficaz contra el VHC emplea una combinación de interferón alfa y ribavirina, conduciendo a una eficacia sustancial en el 40 % de los pacientes. No obstante, los resultados clínicos demuestran que el interferón alfa pegilado es superior al interferón alfa no modificado como monoterapia. No obstante, incluso con pautas terapéuticas experimentales que conllevan combinaciones de interferón alfa pegilado y ribavirina, una fracción sustancial de pacientes no experimenta una reducción sostenida en la carga vírica. Así, existe la necesidad clara y no satisfecha de desarrollar procedimientos terapéuticos eficaces para el tratamiento de infección por VHC.

El VHC es un virus de ARN de polaridad positiva. Tomando como base la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida y la extensa similitud en la región sin traducir 5', el VHC se ha clasificado como un género separado en la familia de Flaviviridae. Todos los miembros de la familia Flaviviridae presentan viriones encapsulados que contienen un genoma de ARN de polaridad positiva que codifica todas las proteínas específicas del virus conocidas mediante traducción de un marco de lectura abierto, ininterrumpido y único.

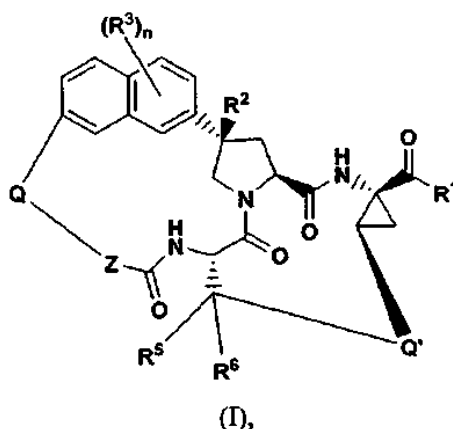
Dentro de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos codificados en todo el genoma del VHC se encuentra una considerable heterogeneidad. Se han caracterizado al menos seis genotipos principales y se han descrito más de 50 subtipos. Los genotipos principales del VHC se diferencian en su distribución en todo el mundo y la significación clínica de la heterogeneidad genética del VHC sigue siendo difícil de conseguir a pesar de numerosos estudios del efecto positivo de genotipos sobre la patogénesis y el tratamiento.

El genoma del ARN monocatenario de VHC tiene una longitud de aproximadamente 9500 nucleótidos y tiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una única poliproteína grande de aproximadamente 3000 aminoácidos. En las células infectadas, esta poliproteína es escindida en múltiples sitios por proteasas celulares y víricas para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). En el caso del VHC, la generación de proteínas no estructurales maduras (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) es llevada a cabo por dos proteasas víricas. La primera se escinde en la unión NS2-NS3; la segunda es una serina proteasa contenida dentro de la región N-terminal de NS3 y media todas las escisiones subsiguientes cadena abajo de NS3, tanto es cis, en el sitio de escisión NS3-NS4A, como en trans, para los sitios restantes NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. La proteína NS4A parece servir para múltiples funciones, actuando como un cofactor para la proteasa NS3 y posiblemente ayudando en la localización de membrana de NS3 y otros componentes de la replicasa vírica. La formación del complejo de la proteína NS3 con NS4A es esencial para procesar eficazmente poliproteínas, potenciando la escisión proteolítica en todos los sitios. La proteína NS3 también muestra actividades de nucleósido trifosfatasa y ARN helicasa. NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que está implicada en la replicación del VHC.

El documento WO2008/057208 describe inhibidores de NS3 de VHC que son tripéptidos ciclados de modo que forman dos macrociclos, uno de los cuales a través de un grupo arilo o heterocíclico unido a prolina mediante un enlazador.

La presente divulgación proporciona compuestos peptídicos que pueden inhibir el funcionamiento de la proteasa NS3, por ejemplo en combinación con la proteasa NS4A. Además, la presente divulgación describe tales compuestos para su uso en tratamiento de combinación en un paciente, por lo que, se puede administrar un compuesto de acuerdo con la presente divulgación, que sea eficaz para inhibir la proteasa NS3 del VHC, con uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC.

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



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

R¹ está seleccionado de hidroxilo y NHSO₂R⁴;

- 5 R² está seleccionado de hidrógeno, alcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfonilo, alquilsulfoxilo e hidroxilo;

cada R³ está seleccionado independientemente de alcoxi, alquilo, ciano, dialquilamino, halo, haloalquilo, haloalcoxi, un heterociclo monocíclico, hidroxilo y fenilo, en el que el heterociclo monocíclico y el fenilo están cada uno opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes, seleccionados independientemente de alcoxi, alquilo, dialquilamino, halo, haloalcoxi y haloalquilo;

- 10 R⁴ está seleccionado de alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterociclilo y NR^aR^b; en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, ciano, cianoalquilo y haloalcoxi;

R⁵ y R⁶ están seleccionados independientemente de hidrógeno, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido con halo,

- 15 R^a y R^b están seleccionados independientemente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo;

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

Q' es una cadena C₄₋₈ saturada o insaturada que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre; estando la cadena opcionalmente sustituida con uno, dos, tres o cuatro grupos seleccionados de alquilo y halo;

Z está seleccionado de CH₂, O y NR^z; en el que R^z está seleccionado de hidrógeno y alquilo.

- 25 En una primera realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es NHSO₂R⁴.

En una segunda realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es NHSO₂R⁴ y en la que n es 1.

- 30 En una tercera realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es NHSO₂R⁴, n es 1, Q es una cadena C₄₋₆ saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo, y Z es O.

En una cuarta realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es NHSO₂R⁴, n es 1, Q es una cadena C₄₋₆ saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo, Z es O y R³ es alcoxi.

- 35 En una quinta realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es NHSO₂R⁴, n es 1, Q es una cadena C₄₋₆ saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo, Z es O, R³ es alcoxi y R² es alcoxi.

En una sexta realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R^1 es $NHSO_2R^4$, n es 1, Q es una cadena C_{4-6} saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo, Z es O, R^3 es alcoxi, R^2 es alcoxi y Q' es una cadena C_{6-8} saturada o insaturada.

- 5 En una séptima realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R^1 es $-NHSO_2R^4$; R^2 es alcoxi; R^4 es cicloalquilo; y R^5 y R^6 son hidrógeno.

- 10 En una octava realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que n es 1; R^1 es $NHSO_2R^4$; en el que R^4 es cicloalquilo; R^2 es alcoxi; R^3 es alcoxi; R^4 y R^5 son hidrógeno, Q es una cadena C_{4-6} saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo; Q' es una cadena C_{4-6} saturada o insaturada sustituida con dos grupos alquilo; y Z es O.

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

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

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

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

- 35 En un cuarto aspecto la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un paciente. En una primera realización del cuarto aspecto, el al menos un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC se administra antes de, después de, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una segunda realización del cuarto aspecto, al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina. En una tercera realización del cuarto aspecto, el interferón está seleccionado de interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A, e interferón tau linfoblastoide.

- 40 En una cuarta realización del cuarto aspecto la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al menos un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC antes de, después de, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que al menos uno de los compuestos adicionales está seleccionado de interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, imiqimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

- 45 En una quinta realización del cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al menos un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC antes de, después de, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana que está seleccionado de metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de

VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, migración de VHC, proteína NS5A de VHC e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.

5 En un quinto aspecto la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar uno, dos, tres, cuatro o cinco compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC antes de, después de, o simultáneamente con el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una primera realización del quinto aspecto, se administran tres o cuatro compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC. En una segunda realización del quinto aspecto, se administran uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad contra el VHC.

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

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

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

Se debe entender que los compuestos comprendidos por la presente divulgación son aquellos que son adecuadamente estables para su uso como un agente farmacéutico.

20 Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en otro lugar en esa molécula. Por ejemplo, cuando n es 2, cada uno de los dos grupos R⁴ puede ser igual o diferente.

En el caso de inconsistencias, prevalecerá la presente divulgación, incluyendo definiciones.

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

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

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

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

El término “alquilsulfanilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido a un resto molecular principal mediante un átomo de azufre.

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

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

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

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

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

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

50 El término “cicloalquilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo hidrocarbonado saturado monocíclico o bicíclico que tiene de tres a siete átomos de carbono y cero heteroátomos. Ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo.

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

El término "dialquilamino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a $-NR^pR^q$, en el que R^p y R^q son grupos alquilo. Los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes.

- 5 Los términos "halo" y "halógeno", tal como se usan en el presente documento, se refieren a F, Cl, Br y I.

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

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

- 10 El término "heterociclilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo de cinco, seis o siete miembros que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de cinco miembros tiene de cero a dos enlaces dobles y los anillo de seis y siete miembros tienen de cero a tres enlaces dobles. El término "heterociclilo" también incluye grupos bicíclicos en los que el anillo heterociclilo está condensado con un grupo fenilo, un grupo cicloalqueno monocíclico, un grupo cicloalquilo monocíclico u otro grupo heterociclilo monocíclico y grupos tricíclicos en los que el sistema bicíclico está condensado con un grupo fenilo, un grupo cicloalqueno monocíclico, un grupo cicloalquilo monocíclico u otro grupo heterociclilo monocíclico. Los grupos heterociclilo de la presente invención pueden estar unidos a un resto molecular principal a través de un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno del grupo. Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero sin limitarse a, benzotienilo, furilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxazolilo, piperazinilo, piperidinilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirrolopiridinilo, pirrolilo, tiazolilo, tienilo y tiomorfolinilo.

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

El término "hidroxilo", como se usa en el presente documento, se refiere a $-OH$.

- 25 El término " $-NR^aR^b$," tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos grupos, R^a y R^b que están unidos a un resto molecular principal a través de un átomo de nitrógeno. R^a y R^b están seleccionados independientemente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo.

- 30 Se pretende que la presente divulgación incluya todos los isótopos de los átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Como ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Por lo general, los compuestos de la invención marcados isotópicamente se pueden preparar por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o por procesos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado en otros casos. Tales compuestos pueden tener una diversidad de usos potenciales, por ejemplo como patrones y reactivos en determinación de actividad biológica. En el caso de los isótopos estables, dichos compuestos pueden tener el potencial de modificar favorablemente las propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

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

- 55 Durante el aislamiento final y purificación de los compuestos se pueden preparar sales de adición básicas haciendo reaccionar un grupo ácido con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina

cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, *N,N*-dimetilnilina, *N*-metilpiperidina, *N*-metilmorfolina, dicitlohexilamina, procaína, dibencilamina, *N,N*-dibencilfenetilamina y *N,N'*-dibenciletildiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básicas incluyen etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad contra el VHC" significa que el compuesto es eficaz para tratar el virus VHC.

La expresión "compuestos de la divulgación" y expresiones equivalentes significan que abarcan compuestos de fórmula (I), y enantiómeros, diastereómeros y sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. De modo similar, las referencias a intermedios significan que abarcan sus sales cuando el contexto así lo permita.

El término "paciente" incluye seres humanos y otros animales.

El término "composición farmacéutica" significa una composición que comprende un compuesto de la divulgación en combinación con al menos un vehículo farmacéutico adicional, es decir, coadyuvante, excipiente o vehículo, tal como diluyentes, agentes conservantes, cargas, agentes reguladores de flujo, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes de dispensación, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y de las formas posológicas. Pueden usarse, por ejemplo, los ingredientes que se enumeran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, EEUU (1999).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas posológicas que son, dentro del ámbito de un juicio médico cabal, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación proporcional a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

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

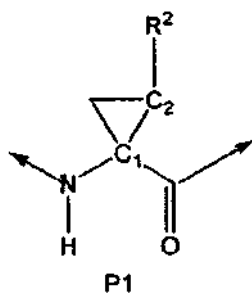
El término "sulfoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a $-S(O)-$.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo que sea suficiente para mostrar un beneficio del paciente significativo, por ejemplo, una reducción sostenida de la carga vírica. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplican a una combinación, los términos se refieren a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o simultáneamente.

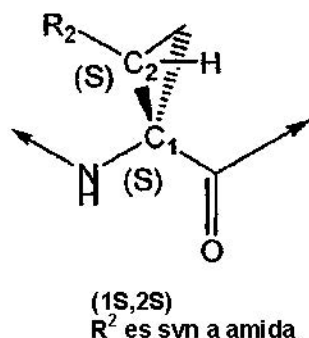
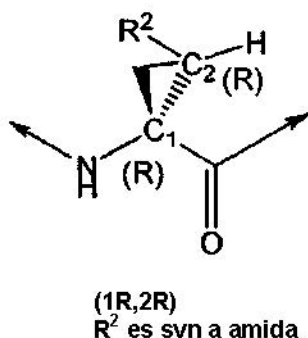
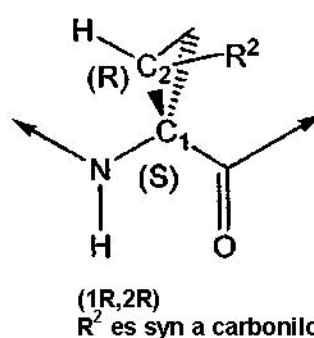
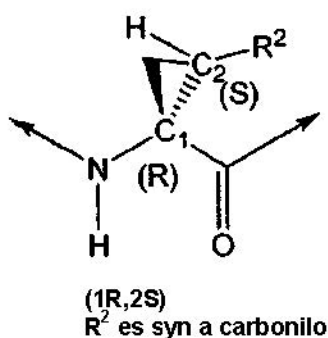
Los términos "trato" y "tratar" se refieren a: (i) prevenir que una enfermedad, trastorno o afección tenga lugar en un paciente, que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero que todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; y/o (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o condición, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección.

Cuando se usan en compuestos que se mencionan en la presente divulgación, las denominaciones P1', P1, P2, P2*, P3 y P4, tal como se usan en el presente documento, cartografían las posiciones relativas de los restos de aminoácidos de unión de un inhibidor de proteasa referentes a la unión de un sustrato de escisión de un péptido natural. La escisión tiene lugar en el sustrato natural entre P1 y P1' en el que las posiciones no preferenciales de los aminoácidos mencionados comienzan por el extremo terminal C del sitio de escisión natural del péptido y se extienden hacia el extremo N, mientras que las posiciones preferenciales dimanan del extremo terminal N de la designación del sitio de escisión y se extienden hacia el extremo C. Por ejemplo, P1' se refiere a la primera posición alejada del extremo a la derecha del extremo C del sitio de escisión (es decir, primera posición del extremo N); mientras que P1 comienza la numeración desde el lado izquierdo del sitio de escisión del extremo C, P2: segunda posición desde el extremo C, y así sucesivamente). (véase Berger A. y Schechter I., Transactions of the Royal Society London series (1970), B257, 249-264].

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



en la que cada uno de C₁ y C₂ representa un átomo de carbono asimétrico en las posiciones 1 y 2 del anillo ciclopropilo.



- 5 Debe entenderse que la divulgación abarca todas las formas estereoquímicas, o mezclas de las mismas, que poseen la capacidad de inhibir la proteasa del VHC.

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

- 10

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

- 15 Cuando sea posible que, para uso en terapia, se puedan administrar cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto de fórmula (I), así como que sales farmacéuticamente aceptables del mismo, como material en bruto, es posible presentar el ingrediente activo como una composición farmacéutica. De acuerdo con ello, la divulgación proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas, que incluyen cantidades terapéuticamente efectivas de compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son como se describen anteriormente. El/los vehículo(s), diluyente(s), o excipiente(s)
- 20 deben ser aceptables en el sentido de que sean compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no

perjudiciales para el receptor de los mismos. De acuerdo con otro aspecto de la divulgación se proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse en formas de monodosis que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por monodosis. En una monoterapia para la prevención y tratamiento de enfermedad mediada por VHC son típicos niveles de dosis que varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150 miligramos por kilogramo ("mg/kg") de peso corporal por día, preferentemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos de la divulgación. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o, de forma alternativa, en forma de infusión continua. Dicha administración se puede usar como terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo de la afección que se esté tratando, de la gravedad de la afección, del tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción del compuesto usado, la duración del tratamiento y la edad, sexo, peso y afección del paciente. Las formulaciones monodosis son las que contienen una dosis o subdosis diaria, tal como se indica anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas de un principio activo. En general, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas sustancialmente por debajo de la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. En general, el compuesto se administra, de la forma más deseable a un nivel de concentración que generalmente conseguirá resultados eficaces como antivíricos sin provocar efectos secundarios dañinos o perjudiciales.

10 Cuando las composiciones de la presente divulgación comprenden una combinación de un compuesto de la divulgación y uno más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional pueden estar presentes en una dosis que es inferior o igual a la dosis que se administra normalmente en una pauta de monoterapia. Las composiciones de esta divulgación pueden formularse junto con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, en forma de un comprimido monolítico y/o doble o multicapa o pueden administrarse de forma separada del(de los) agente(s) terapéutico(s) o profiláctico(s).

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

20 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite.

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

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

35 Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulando o formando pequeños cilindros, añadiendo un lubricante y disgregante, y prensando en comprimidos. Se prepara una mezcla en polvo mezclando el compuesto, molido adecuadamente, con un diluyente o base como se describe anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinilpirrolidina, un retardante de solución tal como parafina, un acelerador de la resorción tal como una sal cuaternaria y/o agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular por humectación con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de goma arábiga, o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a pasar a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla en polvo puede hacerse pasar

- por la máquina compresora y el resultado son pequeños cilindros de forma imperfecta que se descomponen en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar que se adhieran a los troqueles conformadores de comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime después en comprimidos. Los compuestos de la presente divulgación se pueden combinar
- 5 también con un vehículo inerte fluido y se pueden comprimir en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o formación de pequeños cilindros. Se puede proporcionar un revestimiento protector transparente u opaco constituido por un revestimiento sellante de goma laca, un revestimiento de azúcar o de material polimérico, y un revestimiento pulido de cera. Se pueden añadir tintes a estos recubrimientos para distinguir dosificaciones unitarias diferentes.
- 10 Los fluidos orales tales como una solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria tal que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa con sabor adecuado, mientras que los elixires se preparan con el uso de un vehículo no tóxico. Se pueden añadir también solubilizadores y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxitilén sorbitol, conservantes, aditivo aromático tal como aceite de menta
- 15 o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.
- Cuando sea apropiado, se pueden encapsular las formulaciones de monodosis para administración. La formulación se pueden preparar también para prolongar o mantener la liberación como por ejemplo revistiendo o incrustando material en forma de partículas en polímeros, ceras, o similares.
- 20 Los compuestos de fórmula (I), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden administrar también en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.
- Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden administrar también mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que están acopladas las
- 25 moléculas de compuestos. Los compuestos pueden estar acoplados también con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles a diana. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidafenol, polihidroxietilaspirtamidafenol o polietilénóxidopolilisina sustituida con residuos de palitoilo. Además, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.
- 30 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que se desea que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis de un receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede administrar desde el parche por iontoforesis como se describe generalmente en *Pharmaceutical Research*, 3 (6), 318 (1986).
- 35 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites.
- Para tratamientos del ojo o de otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las formulaciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo se
- 40 puede usar bien con una base parafínica o bien con una base de pomada mezclable en agua. De forma alternativa, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de aceite en agua o con una base de agua en aceite.
- Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas para el ojo incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.
- 45 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen tabletas, pastillas y enjuagues bucales.
- Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o como enemas.
- 50 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo de tratamiento que se administra de la manera en la que se toma el rape, es decir por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo sujetado cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas o soluciones oleosas de ingrediente activo.
- 55 Las formulaciones adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o neblinas de partículas finas, que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores, o insufladores presurizados en dosis medidas.

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

- 5 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes en suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de monodosis o de multidos, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.
- 10

Además, debe entenderse que de los ingredientes mencionados antes en particular, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que se han considerado para el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

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

Tabla 1

<i>Nombre comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Compañía suministradora</i>
NIM811		Inhibidor de ciclofilina	Novartis
Zadaxin		Inmunomodulador	Sciclone
Suvus		Azul de metileno	Bioenvision
Actilon (CPG10101)		Agonista de TLR9	Coley
Batabulin (T67)	Anticanceroso	Inhibidor de β -tubulina	Tularik Inc., South San Francisco, CA
ISIS 14803	Antivirico	Antisentido	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., New York, NY
Summetrel	Antivirico	Antivirico	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
GS-9132 (ACH-806)	Antivirico	Inhibidor del VHC	Achillion / Gilead
Compuestos de pirazolopirimidina y sales del documento WO-2005047288, 26 de mayo de 2005	Antivirico	Inhibidores del VHC	Arrow Therapeutics Ltd.
Levovirin	Antivirico	Inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Merimepodib (VX-497)	Antivirico	Inhibidor de IMPDH	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
XTL-6865 (XTL-002)	Antivirico	Anticuerpo monoclonal	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Israel
Telaprevir (VX-950, LY-570310)	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa NS3	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA/ Eli Lilly y Co. Inc., Indianapolis, IN
HCV-796	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Wyeth / Viropharma
NM-283	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Idenix / Novartis
GL-59728	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
GL-60667	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
2'C MeA	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gilead

ES 2 414 536 T3

PSI6130	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
R1626	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
2'C Metil adenosine	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Merck
JTK-003	Antivirico	Inhibidor de RdRp	Japan Tobacco Inc., Tokio, Japón
Levovirin	Antivirico	Ribavirina	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
Ribavirin	Antivirico	Ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Viramidin	Antivirico	Profármaco de ribavirina	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA

(continuación)

<i>Nombre comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Compañía suministradora</i>
Heptazyme	Antivirico	Ribozima	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
BILN-2061	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Boehringer Ingelheim Pharma KG; Ingelheim, Alemania
SCH 503034	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Schering Plough
Zadazim	Inmunomodulador	Inmunomodulador	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Mateo, CA
Ceplene	Inmunomodulador	Inmunomodulador	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
CellCept	Inmunosupresor	IgG inmunosupresora de VHC	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Civacir	Inmunosupresor	IgG inmunosupresora de VHC	Nabi Biopharmaceuticals Inc., Boca Raton, FL
Albuferon- α	Interferón	Albúmina IFN- α 2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Infergen A	Interferón	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
Omega IFN	Interferón	IFN- ω	Intarcia Therapeutics
IFN- β y EMZ701	Interferón	IFN- β y EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canadá
Rebif	Interferón	IFN- β 1a	Serono, Ginebra, Suiza
Roferon A	Interferón	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Intron A	Interferón	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Intron A y Zadaxin	Interferón	IFN- α 2b/a1-timosina	RegeneRx Biopharmaceuticals Inc., Bethesda, MD/ SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA

Rebetron	Interferón	IFN- α 2b/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Actimmune	Interferón	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
Interferon- β	Interferón	Interferón β 1a	Serono
Multiferon	Interferón	IFN de acción prolongada	Viragen/Valenti s
Wellferon	Interferón	IFN- α n1linfoblastoide	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, Reino Unido
Omniferon	Interferón	natural IFN- α	Viragen Inc., Plantation, FL
Pegasys	Interferón	IFN- α 2a pegilado	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza

(continuación)

<i>Nombre comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Compañía suministradora</i>
Pegasys y Ceplene	Interferón	IFN- α 2a PEGilado/inmunomodulador	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Pegasys y Ribavirina	Interferón	IFN- α 2a PEGilado/ribavirina	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
PEG-Intrón	Interferón	IFN- α 2b PEGilado	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intron / Ribavirin	Interferón	IFN- α 2b PEGilado/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
IP-501	Protección hepática	Antifibrótico	Indevus Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
IDN-6556	Protección hepática	Inhibidor de caspasa	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
ITMN-191 (R-7227)	Antivírico	Inhibidor de la serina proteasa	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
GL-59728	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Genelabs
ANA-971	Antivírico	Agonista de TLR-7	Anadys
MK 78009	Antivírico	Inhibidor de la serina proteasa	Merck
TMC-435350	Antivírico	Inhibidor de la serina proteasa	Tibotec

- 5 Los compuestos de la divulgación pueden usarse también como reactivos de laboratorio. Los compuestos pueden ser una contribución decisiva para proporcionar herramientas de investigación para diseñar ensayos de replicación del virus, validación de sistemas de ensayo en animales y estudios de biología estructural para potenciar más el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad por VHC. Además, los compuestos de la presente divulgación son útiles para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos antivíricos, por ejemplo, por inhibición competitiva.
- 10 Los compuestos de esta divulgación también pueden ser útiles para tratar o prevenir contaminación vírica de materiales y, por tanto, reducir el riesgo de infección vírica de laboratorio o del personal médico o de pacientes que entren en contacto con tales materiales, por ejemplo, sangre, tejidos, instrumental y prendas quirúrgicas, instrumental y prendas de laboratorio, y aparatos y materiales para la extracción o transfusión de sangre.
- 15 La presente divulgación pretende abarcar compuestos que tienen la fórmula (I) cuando se preparan por procedimientos de síntesis o por procedimientos metabólicos que incluyen los que se producen en el cuerpo humano o animal (*in vivo*) o procedimientos que se producen *in vitro*.

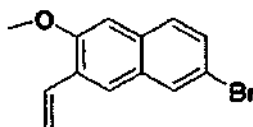
La presente divulgación se describirá ahora en relación con determinadas realizaciones que no se pretende que limiten su alcance. Por el contrario, la presente divulgación abarca todas las alternativas, modificaciones y equivalentes y puede incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones. Así, los siguientes ejemplos, que incluyen realizaciones específicas, ilustrarán una práctica de la presente divulgación, entendiéndose que los ejemplos son para fines de ilustración de determinadas realizaciones y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de sus procedimientos y aspectos conceptuales.

Las abreviaturas usadas en la presente solicitud, incluyendo en particular en los esquemas ilustrativos y en los ejemplos que siguen, se conocen bien por los expertos en la técnica. Algunas de las abreviaturas usadas son como sigue: t.a., ta para temperatura ambiente, TR para tiempo de retención; sat. para saturado; Me para metilo; DIBAL-H para hidruro de diisobutilaluminio; DCM para diclorometano; Ph para fenilo; Ph_3PMeBr para bromuro de metiltrifenilfosfonio; THF para tetrahidrofurano; Et para etilo; EtOAc para acetato de etilo; Et_3N para trietilamina; TMS para trimetilsililo; DMSO para N,N-dimetil sulfóxido; DMF para N,N-dimetilformamida; TAS-F para difluoruro de tris(dimetilamino)azufre(trimetilsililo); TFA para ácido trifluoracético; HATU para fosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; MeOH para metanol; DIEA para diisopropiletilamina; DCE para 1,2-dicloroetano; pTSA para ácido para-tolilsulfónico; y DBU para 1,8-diazabicycloun-dec-7-eno.

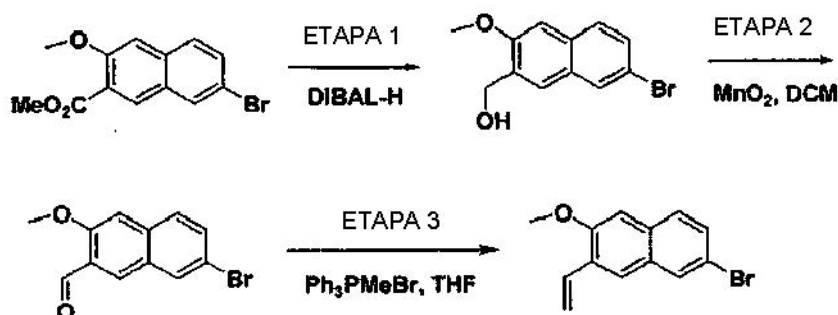
Los materiales de partida útiles para sintetizar los compuestos de la presente divulgación son conocidos para los expertos en la técnica y pueden elaborarse fácilmente o están disponibles comercialmente.

Los siguientes procedimientos expuestos a continuación se proporcionan con fines ilustrativos. Se reconocerá que puede ser necesario preparar un compuesto tal, en el que un grupo funcional esté protegido usando un grupo protector convencional después para retirar el grupo protector para proporcionar un compuesto de la presente divulgación. Los detalles que conciernen al uso de grupos protectores de acuerdo con la presente divulgación se conocen por los expertos en la técnica.

Preparación del Intermedio 1: 6-bromo-2-metoxi-3-vinilnaftaleno



6-bromo-2-metoxi-3-vinilnaftaleno



Etapa 1:

Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (1,0M en hexanos) (112 ml, 112 mmol) lentamente a una solución de 7-bromo-3-metoxi-2-naftoato de metilo (preparada en 3 etapas a partir de ácido 3-hidroxi-2-naftoico de acuerdo con la referencia: J. Med. Chem. 1990, 33, 171) (11 g, 37,3 mmol) en THF (300 ml) a -40°C (acetonitrilo/hielo seco). Después de la adición, la reacción se agitó 3 horas y luego se añadió EtOAc (140 ml) y se retiró el baño de hielo. Después de 5 minutos, se añadió solución 1,0M de HCl (200 ml) y se agitó durante 10 minutos. Los orgánicos se lavaron con solución 1,0M de HCl y salmuera y luego se secaron con MgSO_4 , se filtró y se concentró dando (7-bromo-3-metoxinaftalen-2-il)metanol como un sólido amarillo claro. RMN de ^1H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 2,34 (t, $J = 6,56$ Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 4,83 (d, $J = 6,41$ Hz, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,51 (dd, $J = 8,70, 1,98$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 8,85$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,93 (d, $J = 1,83$ Hz, 1H).

Etapa 2:

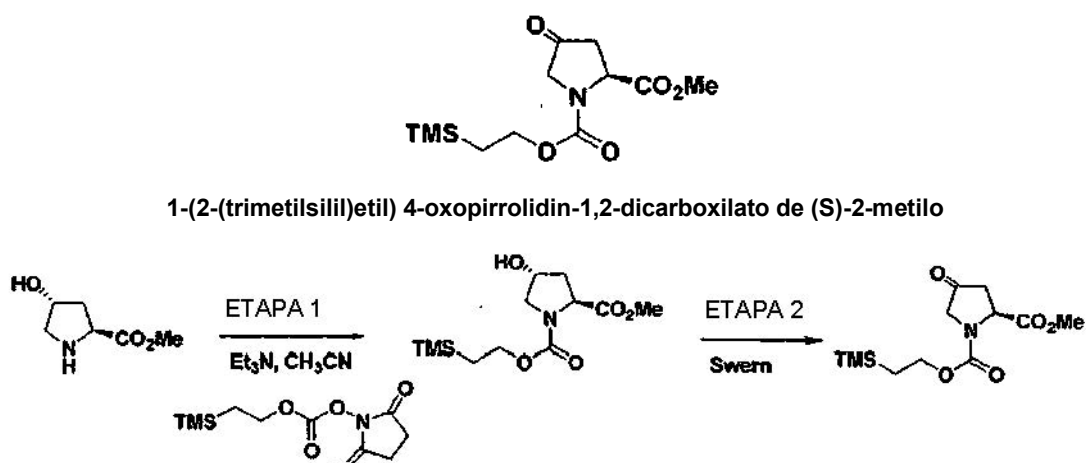
Se añadió dióxido de manganeso (32,5 g, 374 mmol) a una solución de (7-bromo-3-metoxinaftalen-2-il)metanol (10

g, 37,3 mmol) en DCM (400 ml) y se agitó a t.a. durante 7 días. La reacción se filtró a través de tierra de diatomeas (Celite®) y se concentró dando 7-bromo-3-metoxi-2-naftaldehído (9,2 g, 93 % para las dos etapas) como un sólido amarillo. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 4,02 (s, 3H), 7,16 (s, 1H), 7,55 - 7,65 (m, 2H), 8,01 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 10,57 (s, 1H).

5 **Etapa 3:**

Se añadió hidruro sódico (dispersión al 60 % en aceite) (5,55 g, 139 mmol) a una solución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (24,79 g, 69,4 mmol) en THF (100 ml) a 0 °C y se agitó durante 30 minutos. Se añadió una solución de 7-bromo-3-metoxi-2-naftaldehído (9,2 g, 34,7 mmol) en THF (100 ml) y se dejó que la reacción se calentara hasta t.a. durante la noche. La reacción se diluyó con éter y se filtró a través de tierra de diatomeas (Celite®). El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 1-5 % en hexanos) dando 6-bromo-2-metoxi-3-vinilnaftaleno (3,2 g, 35 %) como sólido blanco. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 3,96 (s, 3H), 5,40 (dd, *J* = 10,99, 1,53 Hz, 1H), 5,90 (dd, *J* = 17,55, 1,37 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,13 (dd, *J* = 17,55, 11,44 Hz, 1H), 7,47 (dd, *J* = 8,70, 1,98 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 8,85 Hz, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,92 (d, *J* = 1,83 Hz, 1H).

15 **Preparación del Intermedio 2: 1-(2-(trimetilsilil)etil)-4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo**



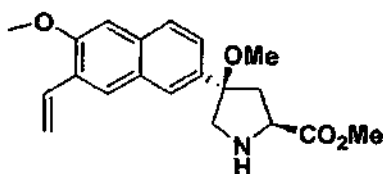
Etapa 1:

20 Se añadió 2-(trimetilsilil)etilcarbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2,5 g, 9,64 mmol) a una solución de 4-hidroxi-2-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo, sal HCl (2,10 g, 11,6 mmol) y trietilamina (4,0 ml, 28,9 mmol) en acetonitrilo (20 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se inactivó con agua y éter. La fase orgánica se lavó con HCl 1,0M (2x) y luego con salmuera. Esta se secó a continuación con MgSO₄ se filtró y se concentró dando 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-2-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo bruto que se usó directamente en la etapa siguiente.

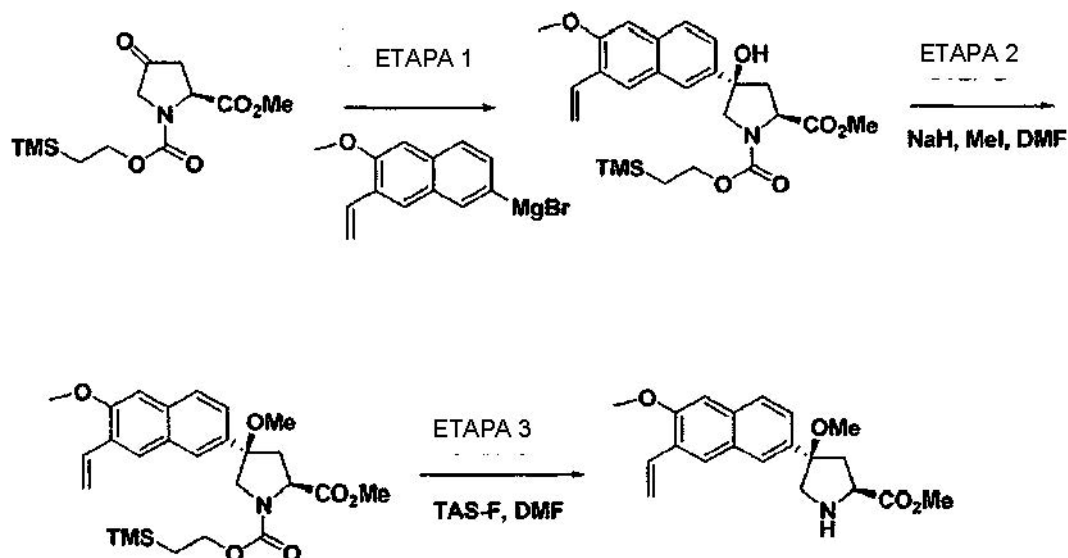
Etapa 2:

30 A una solución de dimetil sulfoxido (3,5 ml, 48,7 mmol) en DCM (100 ml) a - 78 °C se añadió cloruro de oxalilo (2,3 ml, 24,3 mmol) gota a gota. La solución formada se agitó a esta temperatura durante 30 minutos. Se añadió, a - 78 °C, una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-2-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (3,2 g, 11,6 mmol) en DCM (10 ml). La suspensión formada se agitó a - 78 °C durante 1 hora antes de la adición de base de Hunig (9,6 ml, 55,3 mmol) gota a gota. Esta solución se agitó a temperatura ambiente 30 minutos y luego se lavó con HCl 1M y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El aceite marrón claro residual se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al (20-33 % en hexanos) dando 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (2,4 g, 76 %) como un aceite amarillo claro. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,03 (s, 9H), 0,81 - 1,05 (m, 2H), 2,52 - 2,73 (m, 1H), 2,99 - 3,25 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,68 - 3,79 (m, 1H), 3,81 - 3,98 (m, 1H), 4,05 - 4,22 (m, 2H), 4,62 - 4,80 (m, 1H).

Preparación del Intermedio 3: 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo



4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo

**Etapa 1:**

Se agitó magnesio (0,443 g, 18,24 mmol) en un matraz de fondo redondo bajo nitrógeno durante la noche. Se añadió THF (4 ml) al magnesio así como una gota de 1,2-dibromoetano. Esto se calentó hasta 60 °C y, después de 10 minutos a esta temperatura se añadió durante 30 minutos una solución de 6-bromo-2-metoxi-3-vinilnaftaleno (Intermedio 1) (3,2 g, 12,16 mmol) en THF (20 ml). Después de la adición, la reacción había virado a color marrón y se continuó agitando a 70 °C durante 2 horas. Se añadió solución de Grignard (20,8 ml, 10,40 mmol) a una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-oxopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-2-metilo (Intermedio 2) (2,3 g, 8,00 mmol) en tolueno (40 ml) a 0 °C y se agitó durante 1 hora y luego se inactivó con solución saturada de NH₄Cl. La fase acuosa se extrajo con DCM y los orgánicos reunidos se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró dando material bruto. El material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 20-40 % en hexanos) dando 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (1,41 g, 37 %) como sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,05 (s, 9H), 0,95 - 1,09 (m, 2H), 2,36 - 2,55 (m, 1H), 2,67 - 2,83 (m, 1H), 3,79 - 3,87 (m, 4H), 3,90 - 4,04 (m, 4H), 4,16 - 4,30 (m, 2H), 4,49 - 4,68 (m, 1H), 5,38 (dd, *J* = 11,04, 1,51 Hz, 1H), 5,89 (dd, *J* = 17,82, 1,51 Hz, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,14 (dd, *J* = 17,69, 11,17 Hz, 1H), 7,47 (d, *J* = 8,53 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 8,53 Hz, 1H), 7,88 (s, 2H).

Etapa 2:

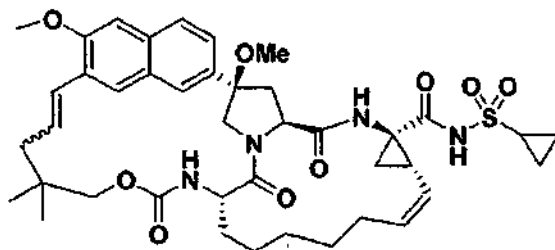
Se añadió NaH (60 % en aceite) (0,229 g, 5,72 mmol) a una solución de 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-hidroxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (1,5 g, 3,18 mmol) y yoduro de metilo (0,36 ml, 5,72 mmol) a 0 °C en DMF (30 ml) y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. La reacción se inactivó a continuación con solución saturada de NH₄Cl y éter. La fase de éter se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró dando material bruto. El material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 20-40 % en hexanos) dando 1-(2-(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (1,1 g, 71 %) como una espuma blanca. CLEM: t.a. = 1,956 minutos, [M+Na]⁺ = 508 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 3:

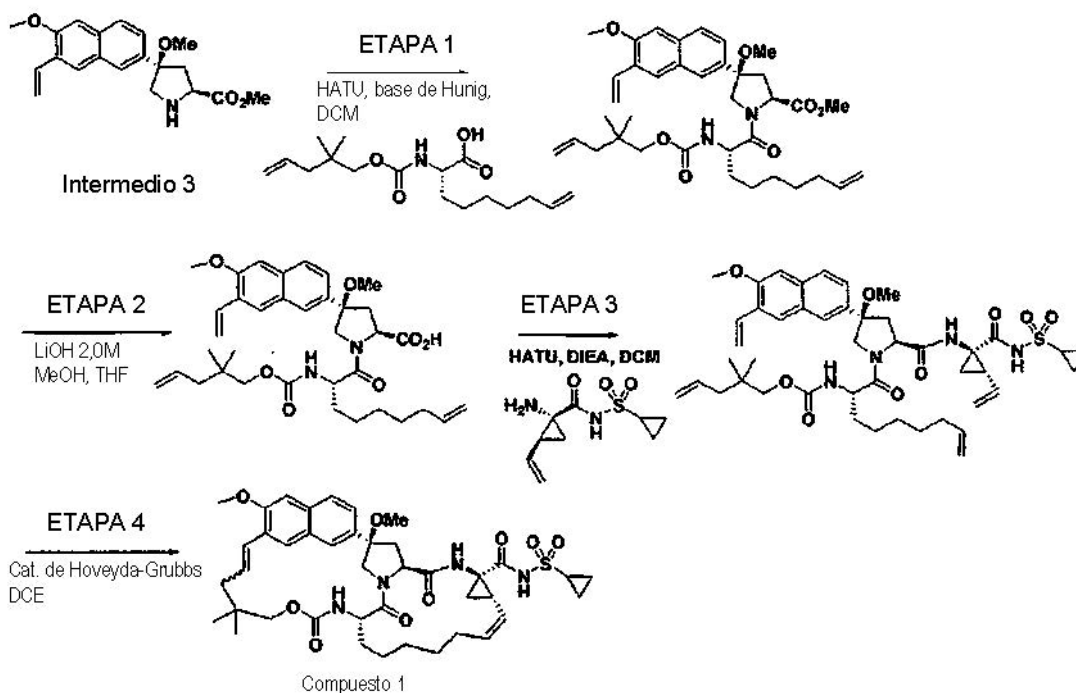
Se añadió difluoruro de Tris(dimetilamino)azufre (trimetilsililo) (2,27 g, 8,24 mmol) a una solución de 1-(2-

(trimetilsilil)etil) 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-2-metilo (1 g, 2,06 mmol) en DMF (10 ml) a 0 °C y luego se dejó calentar hasta t.a. durante la noche. La reacción se vertió en solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con éter y luego con DCM. Los orgánicos reunidos se lavaron con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró dando 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (520 mg, 74 %) como una espuma blanca. RMN de ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 2,49 (dd, *J* = 13,43, 9,77 Hz, 1H), 2,69 (d, *J* = 13,43 Hz, 1H), 2,81 (s, 3H), 3,04 (d, *J* = 11,90 Hz, 1H), 3,53 (d, *J* = 12,21 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,90 - 3,95 (m, 1H), 5,31 (d, *J* = 11,29 Hz, 1H), 5,84 (d, *J* = 17,70 Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 7,08 (dd, *J* = 17,70, 10,99 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 7,59 - 7,68 (m, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,94 (s, 1H).

Ejemplo 1: Preparación del Compuesto 1



Compuesto 1



Etapa 1:

Se añadió HATU (200 mg, 0,527 mmol) a una solución de 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (Intermedio 3, 150 mg, 0,439 mmol), ácido (S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi) carbonilamino)non-8-enoico (205 mg, 0,659 mmol) y base de Hunig (0,23 ml, 1,32 mmol) en DCM (6 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 10-40 % en hexanos) dando 1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi) carbonilamino)non-8-enil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (170 mg, 61 %) como un aceite incoloro. CLEM: t.a. = 2,09 minutos, [M+Na]⁺ = 657 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 2:

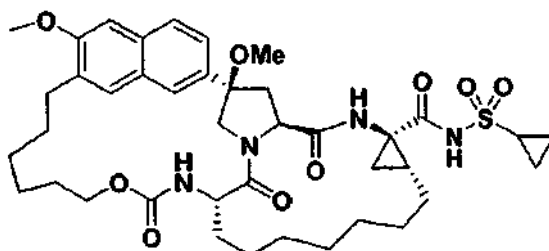
Se añadió LiOH 2,0M (0,67 ml, 1,34 mmol) a una solución de 1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (170 mg, 0,268 mmol) en THF (1 ml) y MeOH (1 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. Se añadieron éter y solución saturada de cloruro amónico y se separó la fase de éter, se filtró y se concentró dando ácido (2S,4R)-1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxílico bruto (152 mg, 91 %). CLEM: t.a. = 1,93 minutos, $[M+Na]^+$ = 643 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 3:

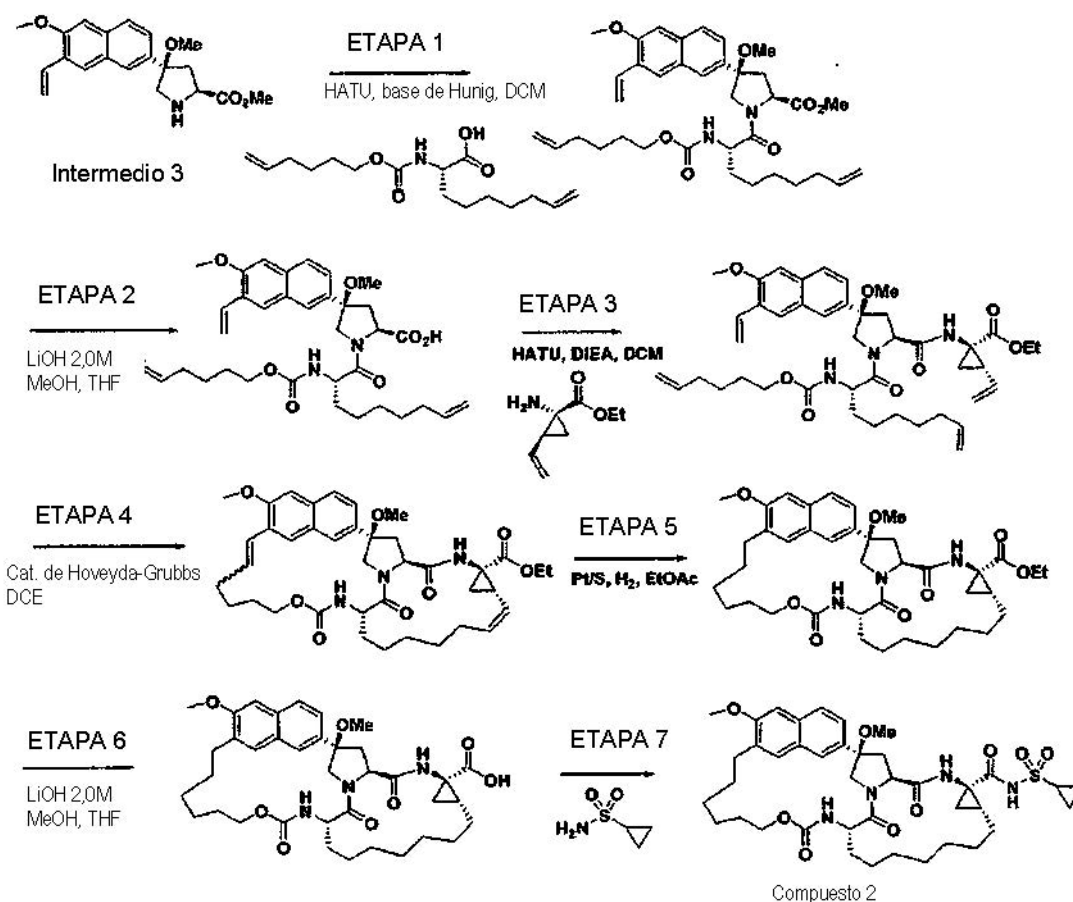
Se añadió HATU (102 mg, 0,269 mmol) a una solución de (1R,2S)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)-2-vinilciclopropanocarboxamida, sal pTSA (148 mg, 0,367 mmol), ácido (2S,4R)-1-((S)-2-((2,2-dimetilpent-4-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxílico (152 mg, 0,245 mmol) y base de Hunig (0,13 ml, 0,74 mmol) en DCM (3 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se concentró y luego se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 20-100 % en hexanos) dando (S)-1-((2S,4R)-2-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonylcarbamoil)-2-vinilciclopropilcarbamoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1-il)-1-oxonon-8-en-2-ilcarbamato de 2,2-dimetilpent-4-enilo (60 mg, 29 %) como un aceite incoloro. CLEM: t.a. = 2,08 minutos, $[M+Na]^+$ = 855 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 4:

Una solución de (S)-1-((2S,4R)-2-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonylcarbamoil)-2-vinilciclo-propilcarbamoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-1-il)-1-oxonon-8-en-2-ilcarbamato de 2,2-dimetilpent-4-enilo (60 mg, 0,072 mmol) en DCE (20 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y luego se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (9 mg, 0,014 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 80 °C durante 3 días. La reacción se concentró dando material bruto. El material bruto se purificó por HPLC prep. (Sunfire C18 10u (30 x 100 mm); caudal = 42 ml/min; gradiente de disolvente = 95:5 hasta 5:95 agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10 mM)) dando una mezcla de compuestos. Esta mezcla se recogió en DCE (20 ml) rociado con nitrógeno durante 30 minutos y luego se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (11 mg, 0,018 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 80 °C durante la noche. La reacción se concentró y el material bruto se purificó por HPLC prep. (Sunfire C18 10u (30 x 100 mm); caudal = 42 ml/min; gradiente de disolvente = 95:5 hasta 5:95 agua/acetonitrilo (con TFA al 0,1 %)) dando Compuesto 1 (1,5 mg, 11 %) como una mezcla de isómero de doble enlace. CLEM: t.a. = 1,83 minutos, $[M+Na]^+$ = 799 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Ejemplo 2: Preparación del Compuesto 2**Compuesto 2**

40

**Etapa 1:**

Se añadió HATU (200 mg, 0,527 mmol) a una solución de 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il) pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (150 mg, 0,439 mmol), ácido (S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino) non-8-enoico (196 mg, 0,659 mmol) y base de Hunig (0,230 ml, 1,318 mmol) en DCM (5 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 10-40 % en hexanos) dando el producto (160 mg, 59 %) como una espuma blanca. CLEM: t.a. = 2,00 minutos, [M+Na]⁺ = 643 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 2:

Se añadió LiOH 2,0M (0,64 ml, 1,28 mmol) a una solución de 1-((S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino) non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (160 mg, 0,258 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se diluyó con HCl 1,0M y éter. Los orgánicos se secaron, se filtró y se concentró dando el producto bruto (145 mg, 93 %) como una espuma blanca. CLEM: t.a. = 1,84 minutos, [M-OMe]⁺ = 575 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego se mantuvo durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 3:

Se añadió HATU (136 mg, 0,358 mmol) a una solución de 1-amino-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo, sal HCl (55 mg, 0,287 mmol), ácido (2S,4R)-1-((S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino) non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxílico (145 mg, 0,239 mmol) y base de Hunig (0,125 ml, 0,717 mmol) en diclorometano (5 ml) y se agitó a t.a. durante 4 horas. La reacción se concentró y luego se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (20-50 % EtOAc en hexanos) dando el producto (120 mg, 68 %) como un aceite incoloro.

CLEM: t.a. = 2,04 minutos, $[M+Na]^+$ = 766 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

5 Etapa 4:

Una solución de 1-((2S,4R)-1-((S)-2-((hex-5-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7- vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo (120 mg, 0,161 mmol) en DCE (50 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y luego se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (2ª generación) (20 mg, 0,032 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 80°C durante la noche. La reacción se concentró dando material bruto. El material bruto se purificó por HPLC prep. (X-bridge C18 10u (30 x 100 mm); caudal = 42 ml/min; gradiente de disolvente = 95:5 hasta 5:95 agua/acetonitrilo (con TFA al 0,1 %)) dando dos productos isoméricos (isómeros de doble enlace en la olefina estirenilo) (reunidos 40 mg, 36 %). CLEM: t.a. = 1,70 y 1,77 minutos, $[M+Na]^+$ = 710 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 5:

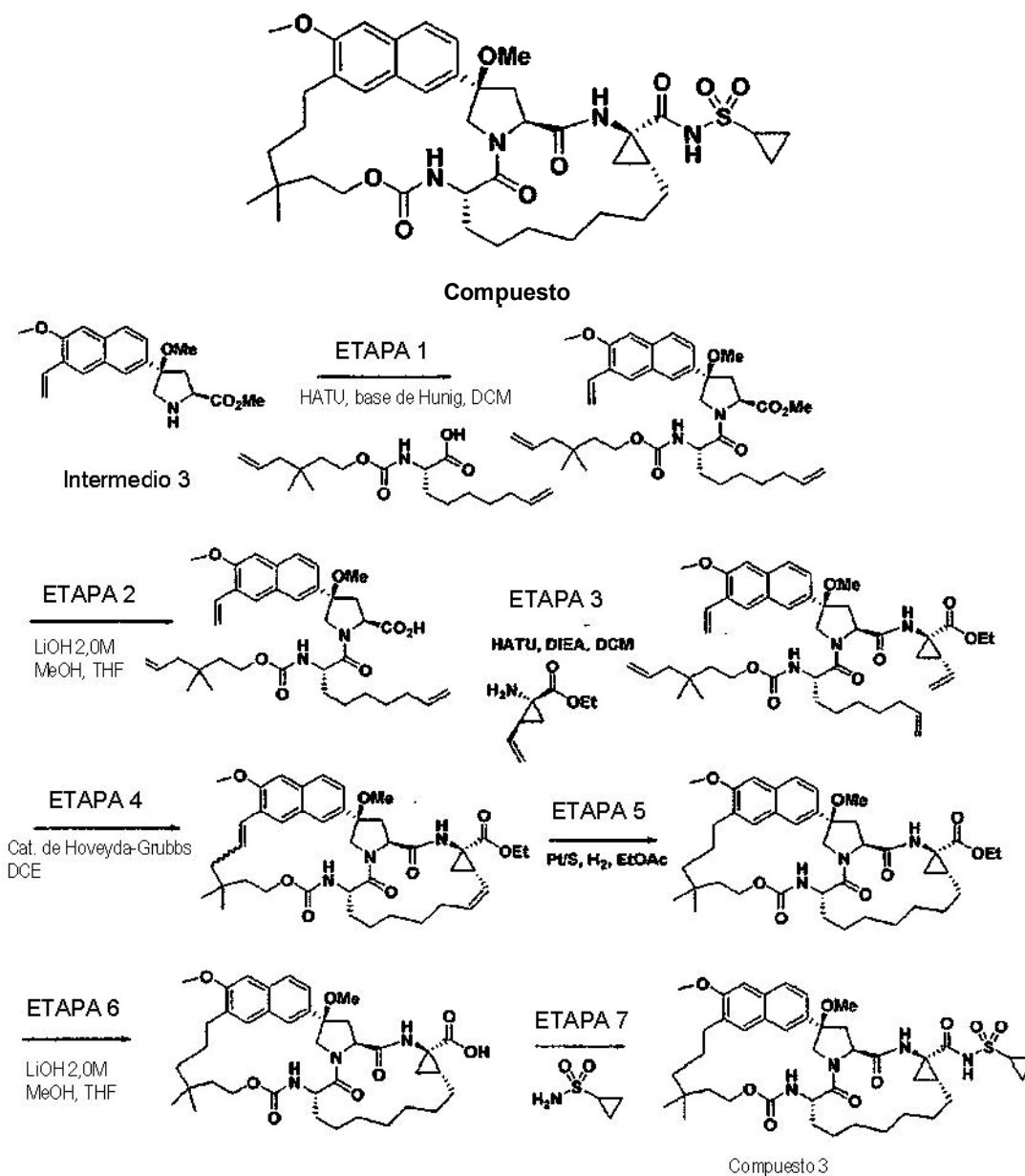
Se añadió platino sulfurado, 5 % en peso en carbón (22 mg, 5,82 mmol) a una solución de los productos de la Etapa 4 (40 mg, 0,058 mmol) en EtOAc (5 ml) y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. La reacción se filtró a través de una frita de nailon para separar el catalizador. Los concentraron los orgánicos y el material bruto se purificó por HPLC prep. (Sunfire C18 10u (30 x100 mm); caudal = 42 ml/min; gradiente de disolvente = 95:5 hasta 5:95 agua/acetonitrilo (con TFA al 0,1 %)) dando el producto (24 mg, 60 %) como sólido blanco. RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,16 - 1,57 (m, 21H), 1,58 - 1,69 (m, 2H), 1,71 - 1,86 (m, 4H), 1,97 - 2,06 (m, 1H), 2,43 (dd, J = 12,82,8,24 Hz, 1H), 2,55 - 2,67 (m, 1H), 2,89 - 3,02 (m, 2H), 3,15 (s, 3H), 3,81 (d, J = 10,68 Hz, 1H), 3,89 - 3,97 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 4,05 - 4,15 (m, 2H), 4,16 - 4,25 (m, 1H), 4,30 (t, J = 8,85 Hz, 1H), 4,73 (td, J = 9,61, 3,05 Hz, 1H), 4,88 (d, J = 10,38 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 9,46 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,17 (s ancho, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,52 (dd, J = 8,55, 1,53 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 8,55 Hz, 1H). CLEM: t.a. = 1,90 minutos, $[M+Na]^+$ = 714 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

30 Etapa 6:

Se añadió LiOH 2,0M (0,087 ml, 0,173 mmol) a una solución del producto de la Etapa 5 (24 mg, 0,035 mmol) en THF (1 ml) y MeOH (1 ml) y se agitó a t.a. durante 3 horas. La reacción se inactivó con HCl 1,0M y se diluyó con éter. Los orgánicos se secaron, se filtró y se concentró dando el producto bruto (16 mg, 70 %). CLEM: t.a. = 1,66 minutos, $[M+Na]^+$ = 686 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 7:

Una solución del producto de la Etapa 6 (16 mg, 0,024 mmol) y 1,1'-carbonildiimidazol (5 mg, 0,031 mmol) en THF (1 ml) se calentó hasta reflujo durante 1 hora. Se retiró el baño de calentamiento y se añadieron ciclopropanosulfonamida (5 mg, 0,041 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (8 μ l, 0,048 mmol) cuando la reacción se enfrió hasta t.a. La reacción se agitó a t.a. durante 3 horas. La reacción se diluyó con acetonitrilo y se purificó por HPLC prep. (X-bridge C18 10u (30 x100 mm); caudal = 42 ml/min; gradiente de disolvente = 95:5 hasta 5:95 agua/acetonitrilo (con acetato amónico 10 mM)). Las fracciones de producto se concentraron dando Compuesto 2 (2 mg, 11 %) como sólido blanco. RMN de 1H (500 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,95 - 1,03 (m, 1H), 1,05 - 1,17 (m, 3H), 1,21 - 1,32 (m, 5H), 1,32 - 1,40 (m, 2H), 1,41 - 1,53 (m, 5H), 1,58 (dd, J = 8,55, 5,49 Hz, 2H), 1,61 - 1,72 (m, 5H), 1,73 - 1,92 (m, 5H), 2,38 (dd, J = 1,75, 6,56 Hz, 1H), 2,65 (t, J = 11,44 Hz, 1H), 2,69 - 2,78 (m, 1H), 2,82 - 2,90 (m, 1H), 2,92 - 3,00 (m, 1H), 3,13 (s, 3H), 3,75 - 3,85 (m, 1H), 3,88 - 3,97 (m, 5H), 4,30 - 4,42 (m, 1H), 4,60 - 4,69 (m, 1H), 5,05 (d, J = 10,38 Hz, 1H), 5,39 (d, J = 8,55 Hz, 1H), 6,24 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,42 - 7,50 (m, 2H), 7,61 (s, 1H), 7,69 (d, J = 8,55 Hz, 1H). CLEM: t.a. = 1,87 minutos, $[M+Na]^+$ = 789 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Ejemplo 3: Preparación del Compuesto 3

3

5 Etapa 1:

Se añadió HATU (668 mg, 1,757 mmol) a una solución de 4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il) pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (500 mg, 1,465 mmol), ácido (S)-2-((3,3-dimetilhex-5-eniloxi) carbonilamino)non-8-enoico (620 mg, 1,904 mmol) y base de Hunig (0,767 ml, 4,39 mmol) en DCM (10 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (EtOAc al 5-30 % en hexanos) dando el producto (520 mg, 55 %) como un aceite espeso. CLEM: t.a. = 2,21 minutos, [M+Na]⁺ = 671 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 2:

15 Se añadió LiOH 2,0M (2,0 ml, 4,0 mmol) a una solución de 1-((S)-2-((3,3-dimetilhex-5-eniloxi) carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (520 mg, 0,801 mmol) en THF (4 ml) y MeOH (4 ml) y se agitó a t.a. durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc y HCl 1,0M. Los orgánicos se secaron, se filtró y se concentró dando el producto bruto (500 mg, 98 %). CLEM: t.a. = 2,06 minutos,

$[M+Na]^+$ = 657 Phenomenex Luna C 18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 3:

- 5 Se añadió HATU (359 mg, 0,945 mmol) a una solución de 1-amino-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo, sal HCl (181 mg, 0,945 mmol), ácido (2S,4R)-1-((S)-2-((3,3-dimetilhex-5-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxílico (500 mg, 0,788 mmol) y base de Hunig (0,413 ml, 2,363 mmol) en diclorometano (10 ml) y se agitó a t.a. durante 4 horas. La reacción se concentró y luego se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (20-50 % EtOAc en hexanos) dando el producto (360 mg, 59 %) como un aceite incoloro. CLEM: t.a. = 2,23 minutos, $[M+Na]^+$ = 794 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 4:

- 15 Una solución de 1-((2S,4R)-1-((S)-2-((3,3-dimetilhex-5-eniloxi)carbonilamino)non-8-enoil)-4-metoxi-4-(6-metoxi-7-vinilnaftalen-2-il)pirrolidin-2-carboxamido)-2-vinilciclopropanocarboxilato de (1R,2S)-etilo (360 mg, 0,466 mmol) en DCE (100 ml) se roció con nitrógeno durante 30 minutos y luego se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs (2ª generación) (59 mg, 0,093 mmol) y la reacción se selló y se calentó hasta 80 °C durante la noche. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (20-60 % EtOAc en hexanos) dando el producto (125 mg, 37 %) como una espuma ligeramente coloreada. CLEM: t.a. = 2,01 minutos, $[M+Na]^+$ = 738 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 5:

- 25 Se añadió platino sulfurado, 5 % en peso sobre carbón (131 mg, 0,034 mmol) a una solución del producto de la Etapa 4 (240 mg, 0,335 mmol) en EtOAc (5 ml) y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. La reacción se filtró a través de una frita de nailon para separar el catalizador. Los orgánicos se concentraron y el material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (20-60 % EtOAc en hexanos) dando el producto puro (120 mg, 50 %) como una espuma blanca. CLEM: t.a. = 2,16 minutos, $[M+Na]^+$ = 742 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = acetonitrilo al 10 % - agua al 90 % - TFA al 0,1 %, Disolvente B = acetonitrilo al 90 % - agua al 10 % - TFA al 0,1 %; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 6:

- 35 Se añadió LiOH 2,0M (0,417 ml, 0,833 mmol) a una solución del producto de la Etapa 5 (120 mg, 0,167 mmol) en THF (1,5 ml) y MeOH (1,5 ml) y se agitó durante 4 días a t.a. La reacción se inactivó con EtOAc y HCl 1,0M. Los orgánicos reunidos se secaron con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró dando el producto bruto (75 mg, 65 %) como un sólido vítreo. CLEM: t.a. = 1,98 minutos, $[M-H]^-$ = 690 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = 10 % metanol - agua al 90 % - acetato amónico 10 mM, Disolvente B = 90 % metanol - agua al 10 % - acetato amónico 10 mM; gradiente = 0 % hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 μ l; longitud de onda = 220 nm.

Etapa 7:

- 45 Se llevó a reflujo durante dos horas una mezcla del producto de la Etapa 6 (75 mg, 0,108 mmol) y di(1H-imidazol-1-il)metanona (26 mg, 0,163 mmol) en THF (2 ml). Se enfrió entonces hasta t.a. y se añadió ciclopropanosulfonamida (21 mg, 0,173 mmol), seguido por DBU (0,026 ml, 0,173 mmol). Esta se agitó a continuación a t.a. durante la noche. La reacción se inactivó con agua y se extrajo con EtOAc. Los orgánicos se secaron con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró dando el producto bruto. El material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en la Biotage (acetona al 20-40 % en hexanos) dando el producto puro (33 mg, 36 %) como sólido blanco. RMN de 1H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,81 - 1,11 (m, 5H), 0,90 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,11 - 1,51 (m, 12H), 1,52 - 1,89 (m, 10H), 2,33 (dd, *J* = 11,80, 6,78 Hz, 1H), 2,54 - 2,67 (m, 1H), 2,70 - 2,85 (m, 2H), 2,85 - 2,97 (m, 1H), 3,10 (s, 3H), 3,65 (dd, *J* = 10,16, 6,90 Hz, 1H), 3,89 (d, *J* = 9,79 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 4,00 - 4,12 (m, 1H), 4,43 (td, *J* = 10,98, 5,14 Hz, 1H), 4,49 - 4,59 (m, 1H), 5,14 (d, *J* = 9,54 Hz, 1H), 5,40 (d, *J* = 8,03 Hz, 1H), 6,39 (s ancho, 1H), 7,03 (s, 1H), 7,37 (dd, *J* = 8,53, 1,25 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,78 Hz, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 10,29 (s ancho, 1H). CLEM: t.a. = 2,03 minutos, $[M-H]^-$ = 793 Phenomenex Luna C18 10u (3 x 50 mm); Disolvente A = 10 % metanol - agua al 90 % - acetato amónico 10 mM, Disolvente B = 90 % metanol - agua al 10 % - acetato amónico 10 mM; gradiente = 0 %

hasta 100 % de disolvente B durante 2 minutos y luego mantenido durante 1 minuto; 4 ml/min; vol. inyección = 5 µl; longitud de onda = 220 nm.

Estudios biológicos

5 En la presente divulgación se usaron ensayos enzimáticos del complejo proteasa NS3/4A del VHC y ensayos del replicón del VHC basados en células, y se prepararon, llevaron a cabo y validaron como sigue:

Generación de complejo proteasa NS3/4A del VHC recombinante

10 Se generaron complejos de proteasa NS3 del VHC, derivados de cepas BMS, cepas H77 o cepas J4L6S como se describe a continuación. Estas proteínas recombinantes purificadas se generaron para su uso en un ensayo homogéneo (véase más adelante) para proporcionar una indicación de la eficacia de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición de la actividad proteolítica de NS3 del VHC.

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

25 Para la producción de complejos de proteasa NS3/4A recombinante se usaron cepas H77 y J4L6S. El AND que codifica el complejo de proteasa NS3/4A del VHC recombinante (aminoácidos 1027 hasta 1711) para estas cepas se manipuló como se describe por P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkuhler C, De Francesco R. Biochemistry. 38(17):5620-32, (1999)). De manera sucinta, se añadió una cola solubilizante de tres lisinas al extremo 3' de la región codificante de NS4A. La cisteína de la posición P1 del sitio de escisión de NS4A-NS4B (aminoácido 1711) se cambió por una glicina para evitar la escisión proteolítica de la marca de lisina. Además, se introdujo una mutación de cisteína a serina por PCR en la posición del aminoácido 1454 para prevenir la escisión autolítica en el dominio de la helicasa NS3. El fragmento de ADN variante se clonó en el vector de expresión bacteriano pET21b (Novagen) y el complejo NS3/4A se expresó en la cepa BL21 (DE3) de Escherichia coli (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por P. Gallinari y col. (véase Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, De Francesco R., J Virol. 72(8):6758-69 (1998)) con modificaciones. De modo resumido, se indujo la expresión del complejo de proteasa NS3/4A con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 milimolar (mM) durante 22 horas (h) a 20 °C. Una fermentación típica (1 litro (l)) produjo aproximadamente 10 gramos (g) de pasta celular húmeda. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (10 ml/g) consistente en ácido N-(2-Hidroxietil)Piperazina-N'-(2-Etano Sulfónico) (HEPES) 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, cloruro sódico 500 mM (NaCl), Triton X-100 al 0,5 %, 1 microgramo/ml (µg/ml) de lisozima, Cloruro de Magnesio 5 mM (MgCl₂), 1 µg/ml de DnaseI, β-mercaptoetanol 5 mM ((βME), Inhibidor de proteasa-Ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) libre (Roche), homogeneizado e incubado durante 20 minutos (min) a 4 °C. El homogeneizado se sometió a ultrasonidos y se aclaró por ultrafiltración a 23 5000 g durante 1 hora (h) a 4 °C. Se añadió imidazol al sobrenadante hasta una concentración final de 15 mM y se ajustó el pH a 8,0. El extracto de proteína bruto se cargó en una columna de níquel-ácido nitroloacético (Ni-NTA) preequilibrada con tampón B (HEPES 25 mM, pH 8,0, glicerol al 20 %, NaCl 500 mM, Triton X-100 al 0,5 %, imidazol 15 mM, βME 5 mM). La mezcla se cargó a un caudal de 1 ml/min. La proteína se eluyó con 15 volúmenes de columna de tampón C (similar al tampón B, pero con Triton X-100 al 0,2 %). La proteína se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón D (similar al tampón C, pero con imidazol 200mM).

50 Las fracciones que contienen complejo de proteasa NS3/4A se agruparon y cargaron en una columna de desalación Superdex-S200 preequilibrada con tampón D (HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, NaCl 300 mM, Triton X-100 al 0,2 %, βME 10 mM). La mezcla se cargó a un caudal de 1 ml/min. Se agruparon y concentraron las fracciones que contenían complejo de proteasa NS3/4A hasta aproximadamente 0,5 mg/ml. Se determinó que la pureza de los complejos de proteasa NS3/4A, derivados de las cepas BMS, H77 y J4L6S, era superior a un 90 % mediante análisis SDS-PAGE y de espectroscopía de masas. La enzima se almacenó a -80 °C, se descongeló en hielo y se diluyó antes de usar en el tampón de ensayo.

55 *Ensayo de péptidos FRET para controlar la actividad proteolítica de NS3/4A del VHC*

El objeto de este ensayo *in vitro* fue medir la inhibición de complejos de proteasa NS3 del VHC, derivados de cepas

BMS, H77 o J4L6S, tal como se describe a continuación, por compuestos de la presente divulgación. Este ensayo proporciona una indicación de la eficacia de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición de la actividad proteolítica de NS3 del VHC.

5 Para controlar la actividad de la proteasa NS3/4A del VHC, se usó un sustrato peptídico de NS3/4A. El sustrato fue RET S1 (sustrato de transferencia de energía de resonancia; AnaSpec, Inc. cat n.º 22991) (péptido FRET), descrito por Taliani y col. en *Anal. Biochem.* 240(2):60-67 (1996). La secuencia de este péptido se basa de modo aproximado en el sitio de escisión natural de NS4A/NS4B para la proteasa NS3 del VHC, con la excepción de que existe un enlace estérico en vez de una unión amídica en el sitio de escisión. El péptido contiene también un donador de fluorescencia, EDANS, cerca de un extremo del péptido, y un aceptor de fluorescencia, DABCIL0, cerca del otro extremo. La fluorescencia del péptido se inactiva mediante transferencia de energía de resonancia (RET) intermolecular entre el donador y el aceptor, pero como la proteasa NS3 escinde el péptido, los productos se liberan de la inactivación RET y la fluorescencia del donador se vuelve aparente.

15 El sustrato peptídico se incubó con uno a tres complejos de proteasa NS3/4A recombinantes, en ausencia o presencia de un compuesto de la presente divulgación. Los efectos inhibitorios de un compuesto se determinan mediante seguimiento de la formación de productos de reacción fluorescentes en tiempo real usando un Cytofluor Series 4000.

Las reactivos fueron los siguientes: HEPES y glicerol (Ultrapure) se obtuvieron de GIBCO-BRL. Se obtuvo dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma. Se obtuvo β -mercaptoetanol de Bio Rad.

20 Tampón de ensayo: HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,15 M; Triton al 0,1 %; glicerol al 15 %; β ME 10 mM. Sustrato: concentración final 2 μ M (de una solución madre 2 mM en DMSO almacenada a -20 °C). Tipo 1a (1b) de proteasa NS3/4A del VHC, 2-3 nM de concentración final (de una solución madre 5 μ M en HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, NaCl 300 mM, Triton-X100 al 0,2 %, β ME 10 mM). Para compuestos con potencias que se acercan al límite del ensayo, el ensayo se vuelve más sensible añadiendo seroalbúmina bovina 50 μ g/ml (Sigma) al tampón de ensayo y reduciendo la concentración final de proteasa hasta 300 pM.

25 El ensayo se realizó en una placa negra de poliestireno de 96 pocillos de Falcon. Cada pocillo contenía 25 μ l de complejo de proteasa NS3/4A en tampón de ensayo, 50 μ l de un compuesto de la presente divulgación en DMSO al 10 %/tampón de ensayo y 25 μ l de sustrato en tampón de ensayo. Se preparó también un control (sin compuesto) en la misma placa de ensayo. El complejo de enzima se mezcló con soluciones de compuesto o control durante 1 min antes de iniciar la reacción enzimática mediante la adición de sustrato. La placa de ensayo se leyó inmediatamente usando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). El instrumento se calibró para leer a una emisión de 340 nm y excitación de 490 nm a 25 °C. Las reacciones se siguieron en general durante aproximadamente 15 minutos.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

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

35 en el que δF es el cambio en la fluorescencia sobre el intervalo lineal de la curva. Se aplicó un ajuste de la curva no lineal a los datos de inhibición-concentración, y la concentración eficaz al 50 % (CI_{50}) se calculó mediante el uso del programa Excel XLfit usando la ecuación, $y=A+((B-A)/(1+((C/x)^D)))$.

Se encontró que los compuestos de la presente divulgación, que se probaron frente a más de un tipo de complejo de NS3/4A, tenían propiedades inhibitorias similares, aunque los compuestos demostraron de forma uniforme una potencia superior frente a cepas 1b en comparación con la cepas 1a.

40 *Ensayos de especificidad*

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

45 Las especificidades de los compuestos de la presente divulgación se determinaron frente a una diversidad de serina proteasas: elastasa neutrófila humana (HNE), elastasa pancreática porcina (PPE) y quimiotripsina pancreática humana y una cisteína proteasa: catepsina hepática humana B. En todos los casos se usó un protocolo con formato de placa de 96 pocillos usando un sustrato fluorométrico de Amino-Metil-Cumarina (AMC) específico para cada enzima como se ha descrito con anterioridad (solicitud de patente PCT n.º WO 00/09543) con algunas modificaciones respecto a los ensayos de serina proteasa. Todas las enzimas se adquirieron de Sigma, EMDbiosciences, mientras que los sustratos lo fueron de Bachem, Sigma y EMDbiosciences.

50 Las concentraciones de compuesto variaron de 100 a 0,4 μ M, dependiendo de su potencia. Cada uno de los ensayos enzimáticos se inició mediante la adición de sustrato al inhibidor preincubado durante 10 min a temperatura ambiente e hidrólisis hasta un 15 % de conversión como medida del Citofluor.

Las condiciones finales para cada ensayo se realizaron como sigue:

Clorhidrato de tris(hidroxiometil) aminometano (Tris-HCl) 50 mM, pH 8, sulfato de sodio (Na₂SO₄) 0,5 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DMSO al 3 %, Tween-20 al 4,01 % con LLVY-AMC 5 μM y quimi tripsina 1 nM.

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

NaOAC (acetato de sodio) 100 mM, pH 5,5, DMSO al 3 %, TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) 1 mM, catepsina B 5 nM (solución madre de enzimas activada en tampón que contiene TCEP 20 mM antes de su uso), y Z-FR-AMC 2 μM diluido en H₂O.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula:

$$10 \quad [1 - ((UV_{inh} - UV_{blanco}) / (UV_{control} - UV_{blanco}))] \times 100$$

Se aplicó un ajuste de la curva no lineal a los datos de inhibición-concentración, y se calculó la concentración eficaz al 50 % (CI₅₀) usando el programa Excel XLfit.

Generación del replicón del VHC

15 Se estableció un sistema de células completo del replicón del VHC tal como se describe por Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R., Science 285(5424):110-3 (1999). Este sistema nos permitió evaluar los efectos de nuestros compuestos de proteasa del VHC sobre la replicación del ARN del VHC. De modo resumido, usando la secuencia de la cepa 1b del VHC que se describe en el artículo de Lohmann (Número de acceso: AJ238799), se sintetizó un ADNc del VHC por Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA. EEUU), y se ensambló después el replicón de longitud completa en el plásmido pGem9zf(+) (Promega, Madison, WI) usando técnicas convencionales de biología molecular. El replicón consiste en (i) la 5' UTR del VHC condensada a los 12 primeros aminoácidos de la proteína del cápside, (ii) el gen neomicina fosfotransferasa (neo), (iii) el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), y (iv) genes NS3 a NS5B del VHC y la 3' UTR del VHC. Los ADN plásmidos se linealizaron con Scal y los transcritos de ARN se sintetizaron *in vitro* usando el kit de transcripción T7 MegaScript (Ambion, Austin, TX, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los transcritos *in vitro* del ADNc se transfecaron en la línea celular de hepatoma humano, HUH-7 Se consiguió la selección de células que expresan de forma constitutiva el replicón del VHC en presencia del marcador seleccionable, neomicina (G418). Las líneas celulares resultantes se caracterizaron por la producción de ARN de polaridad positiva y negativa y producción de proteína con el paso del tiempo.

Ensayo FRET del replicón del VHC

30 El ensayo FRET del replicón del VHC se desarrolló para comprobar los efectos inhibidores de compuestos descritos en la presente divulgación sobre la replicación vírica del VHC. Se cultivaron células HUH-7, que expresan constitutivamente el replicón del VHC, en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL) que contiene suero de ternero fetal al 10 % (FCS) (Sigma) y 1 mg/ml de G418 (Gibco-BRL). Las células se sembraron la noche anterior (1,5 x 10⁴ células/pocillo) en placas estériles de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Los controles con compuesto y sin compuesto se prepararon en DMEM que contenía FCS al 4 %, 1:100 penicilina/estreptomina (Gibco-BRL), 1:100 L-glutamina y DMSO al 5 % en la placa de dilución (DMSO al 0,5 % de concentración final del ensayo). Se añadieron mezclas de compuesto/DMSO a las células y se incubaron durante 4 días a 37 °C. Después de 4 días, las células se evaluaron por citotoxicidad usando Alamar azul (Trek Diagnostc Systems) para una lectura de CC₅₀. La toxicidad del compuesto (CC₅₀) se determinó añadiendo 1/10^o de volumen de azul Alamar al medio de incubación de las células. Después de 4 h, se leyó la señal de fluorescencia de cada pocillo, con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm, usando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). Las placas se lavaron después a conciencia con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (3 veces 150 μl). Las células se lisaron con 25 μl de un reactivo de ensayo de lisis que contenía sustrato de proteasa del VHC (5X reactivo de lisis de cultivo de células de luciferasa celular (Promega n. ° E153A) diluido a 1X con agua destilada, se añadió NaCl a una concentración 150 mM final, el sustrato peptídico FRET (tal como se ha descrito para el ensayo enzimático anterior) diluido a una concentración final de 10 μM a partir de una solución madre 2 mM en DMSO al 100 %. La placa se situó en el instrumento Cytofluor 4000, ajustado a 340 nm de excitación/490 nm de emisión, en modo automático para 21 ciclos y la placa se leyó en modo cinético. Las determinaciones de CE₅₀ se llevaron a cabo como se ha descrito para las determinaciones de CI₅₀.

50 Ensayo del indicador de luciferasa del replicón del VHC

Como ensayo secundario, se confirmaron las determinaciones de CE₅₀ a partir del ensayo FRET del replicón en un

ensayo del indicador de luciferasa del replicón. La utilización de un ensayo del indicador del replicón de luciferasa se describió primero por Krieger et al (Krieger N, Lohmann V and Bartenschlager R, J. Virol. 75(10):4614-4624 (2001)). La construcción del replicón descrita por nuestro ensayo FRET se modificó insertando ADNc que codifica una forma humanizada del gen de la luciferasa de Renilla y una secuencia de unión condensada directamente al extremo 3' del gen de la luciferasa. Este inserto se introdujo en la construcción del replicón usando un sitio de restricción AscI localizado en el centro, directamente cadena arriba del gen marcador de neomicina. Se introdujo también la mutación adaptativa en la posición 1179 (serina a isoleucina) (Blight KJ, Kolykhalov, AA, Rice, CM, Science 290(5498):1972-1974). Se generó tal como se ha descrito anteriormente una línea celular estable que expresa constitutivamente esta construcción de replicón del VHC. El ensayo del indicador de luciferasa se ajustó como se describe para el ensayo FRET del replicón del VHC con las siguientes modificaciones. Después de 4 días en un incubador con CO₂ a 37 °C/5 %, se analizaron las células para determinar la actividad de luciferasa de Renilla usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Promega Dual-Glo. Se extrajeron medios (100 µl) de cada pocillo que contenía células. A los restantes 50 µl de medios, se añadieron, 50 µl de reactivo de luciferasa Dual-Glo y las placas se agitaron suavemente durante 10 minutos a 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió reactivo Dual-Glo Stop & Glo (50 µl) a cada pocillo y las placas se agitaron suavemente durante un tiempo adicional de 10 min a 2h a temperatura ambiente. Las placas se leyeron en un Packard TopCount NXT usando un programa de luminiscencia. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula siguiente:

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

Los valores se representaron gráficamente y se analizaron usando XLfit obteniendo valores de CE₅₀.

Los compuestos de la presente divulgación se analizaron y se encontró que tienen la siguiente actividad:

20 Compuesto 1: CI50: 1 nM CE50: 9,8 nM

 Compuesto 2: CI50: 5 nM

 Compuesto 3: CI50: 1 nM

Potencia en el ensayo de luciferasa 1b:

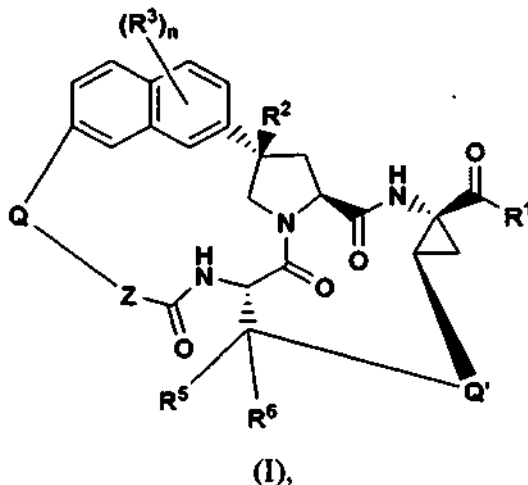
 Compuesto 1: 1,6 nM

25 Compuesto 2: 3,9 nM

 Compuesto 3: 2,7 nM

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

R¹ está seleccionado de hidroxilo y -NHSO₂R⁴;

R² está seleccionado de hidrógeno, alcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfonilo, alquilsulfoxilo e hidroxilo;

10 cada R³ está seleccionado independientemente de alcoxi, alquilo, ciano, dialquilamino, halo, haloalquilo, haloalcoxi, un heterociclo monocíclico, hidroxilo y fenilo; en el que el heterociclo monocíclico y el fenilo están cada uno opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes, seleccionados independientemente de alcoxi, alquilo, dialquilamino, halo, haloalcoxi y haloalquilo;

15 R⁴ está seleccionado de alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterociclilo y NR^aR^b; en el que el alquilo y el cicloalquilo están cada uno opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, ciano, cianoalquilo y haloalcoxi;

R⁵ y R⁶ están seleccionados independientemente de hidrógeno, alcoxi C₁₋₃, haloalcoxi C₁₋₃ y alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido con halo,

R^a y R^b están seleccionados independientemente de hidrógeno, alcoxi, alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, haloalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo;

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

25 Q' es una cadena C₄₋₈ saturada o insaturada que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre; estando la cadena opcionalmente sustituida con uno, dos, tres o cuatro grupos seleccionados de alquilo y halo;

Z está seleccionado de CH₂, O y NR^z; en el que R^z está seleccionado de hidrógeno y alquilo.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ es NHSO₂R⁴.

30 3. Un compuesto de la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n es 1.

4. Un compuesto de la reivindicación 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es una

cadena C₄₋₆ saturada o insaturada opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo y Z es O.

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

6. Un compuesto de la reivindicación 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R² es alcoxi.

7. Un compuesto de la reivindicación 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q' es una cadena C₆₋₈ saturada o insaturada.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R¹ es -NHSO₂R⁴;

R² es alcoxi;

R⁴ es cicloalquilo; y

10 R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

9. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

n es 1;

R¹ es NHSO₂R⁴; en el que R⁴ es cicloalquilo;

R² es alcoxi;

15 R³ es alcoxi;

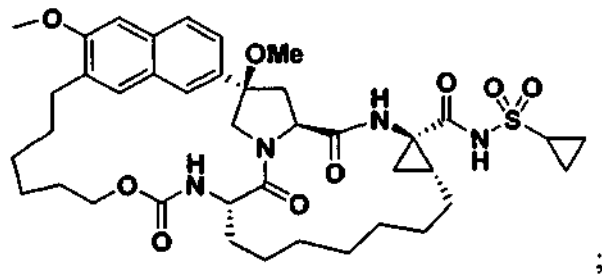
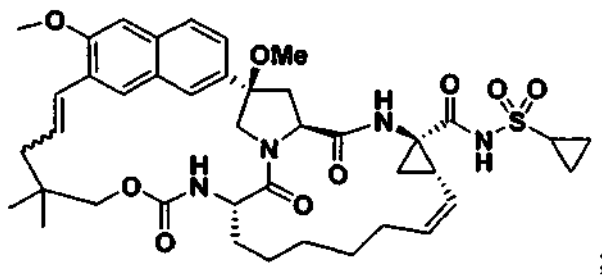
R⁵ y R⁶ son cada uno hidrógeno;

Q es una cadena C₄₋₆ saturada o no sustituida opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo;

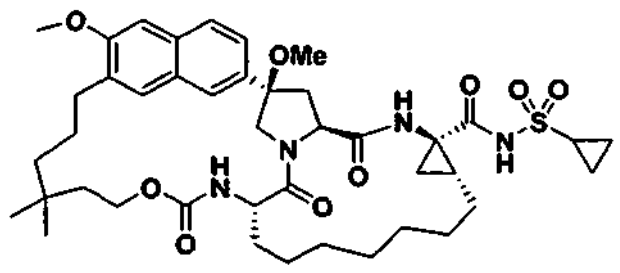
Q' es una cadena C₄₋₆ saturada o no sustituida opcionalmente sustituida con dos grupos alquilo;

Z es O.

20 10. Un compuesto seleccionado de:



y



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 **12.** La composición de la reivindicación 11, que comprende además al menos un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina.

10 **14.** La composición de la reivindicación 13, en la que el interferón está seleccionado de interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.

15. La composición de la reivindicación 12, en la que al menos uno de los compuestos adicionales está seleccionado de interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de la respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

15 **16.** La composición de la reivindicación 12, en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada de metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC e IMPDH para el tratamiento de la infección por VHC.

20 **17.** El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento de tratamiento de una infección por VHC en un paciente.

18. El compuesto o sal para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que, en el procedimiento, se administra al menos un compuesto adicional que tiene actividad contra el VHC antes de, después de, o de forma simultánea, con el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 **19.** El compuesto o sal para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina.

20. El compuesto o sal para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el interferón está seleccionado de interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.

30 **21.** El compuesto o sal para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos uno de los compuestos adicionales está seleccionado de interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de la respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

35 **22.** El compuesto o sal para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada de metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC e IMPDH para el tratamiento de la infección por VHC.