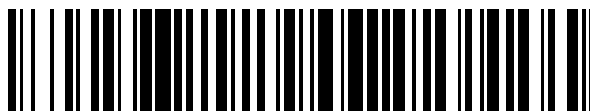


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 815**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2001 E 07012483 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1958956**

54 Título: **Inhibidores peptidomiméticos de proteasa**

30 Prioridad:

31.08.2000 US 229398 P

21.03.2001 US 277641 P

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

25.03.2014

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
50 Northern Avenue
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**BABINE, ROBERT EDWARD;
CHEN, SHU-HUI;
LAMAR, JASON ERIC;
SNYDER, NANCY JUNE;
SUN, XICHENG;
TEBBE, MARK JOSEPH;
VICTOR, FRANTZ;
WANG, MAY Q.;
YIP, MAI YEE YVONNE;
COLLADO, IVAN;
GARCIA-PAREDES, CRISTINA;
PARKER, SAMUEL RAYMOND, III;
JIN, LING;
GUO, DEQI y
GLASS, JOHN IRVIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 450 815 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 peptidomiméticos de proteasa

La presente invención se refiere a compuestos peptidomiméticos e intermedios de los mismos, a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos peptidomiméticos, y al uso de los compuestos peptidomiméticos o composiciones de los mismos como inhibidores de proteasa, particularmente como inhibidores de serina proteasa, y más particularmente como inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C ("HCV"). Los compuestos peptidomiméticos, como inhibidores de la proteasa NS3 de HCV, son particularmente útiles para interferir en el ciclo vital del virus de la hepatitis C y en el tratamiento o prevención de una infección por HCV o afecciones fisiológicas asociadas con la misma. La presente invención también se refiere a compuestos peptidomiméticos o composiciones farmacéuticas, o kits y embalajes farmacéuticos para su uso en procedimientos de terapia de combinación para inhibir la replicación de HCV en células, o para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en pacientes. De acuerdo con la presente invención se incluyen como composiciones farmacéuticas aquellas que comprenden un inhibidor de la serina proteasa de HCV en combinación con un interferón que tiene actividad anti-HCV; un inhibidor de la serina proteasa de HCV en combinación con un compuesto, diferente a un interferón, que tiene actividad anti-HCV; o un inhibidor de la serina proteasa de HCV en combinación tanto con un interferón que tiene actividad anti-HCV como con un compuesto, diferente de un interferón, que tiene actividad anti-HCV. La presente invención se refiere adicionalmente a procedimientos estereoselectivos para preparar intermedios quirales bicicloprolinato útiles en la síntesis de los compuestos peptidomiméticos.

Antecedentes de la invención

La infección por el HCV es un problema médico humano apremiante y ahora está reconocido como agente causante de la mayoría de los casos de hepatitis no A, no B.

Se cree que el HCV infecta de forma crónica al 3% de la población mundial [A. Alberti y col., "Natural History of Hepatitis C," J. Hepatology, 31, (Supl. 1), 17-24 (1999)]. Solamente en los Estados Unidos la tasa de infección es del 1,8% o 3,9 millones de personas [M.J. Alter, "Hepatitis C Virus Infection in the United States," J. Hepatology, 31, (Supl. 1), 88-91 (1999)]. De todos los pacientes infectados más del 70% desarrollan una infección crónica que se cree que es una causa principal de cirrosis y carcinoma hepatocelular. [D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C," J. Viral Hepatitis, 6, 35-47 (1999)].

La replicación del HCV incluye un gen que codifica una poliproteína de 3010-3033 aminoácidos [Q.-L. Choo, y col., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455 (1991); N. Kato y col., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with NonA, Non-B Hepatitis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa y col., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)]. Las proteínas no estructurales (NS) del HCV se supone que proporcionan la maquinaria catalítica esencial para la replicación viral. Las proteínas NS se obtienen por escisión proteolítica de la poliproteína [R. Bartenschlager y col., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", J. Virol., 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui y col. "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Pro- teinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", J. Virol., 67, 2832-2843 (1993); A. Grakoui y col., Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", J. Virol., 67, 1385-1395 (1993); L. Tomei y col., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", J. Virol., 67, 4017-4026 (1993)]. De hecho, se ha demostrado que los primeros 181 aminoácidos de NS3 (restos 1027-1207 de la poliproteína viral) contienen el dominio de serina proteasa de NS3 que procesa los cuatro sitios cadena abajo de la poliproteína de HCV [C. Lin y col., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", J. Virol., 68, 8147-8157 (1994)].

La proteína NS3 (NS3) de HCV contiene una actividad serina proteasa que ayuda al procesamiento en la mayoría de las enzimas virales, y por tanto se considera esencial para la replicación e infectividad viral. La esencialidad de la proteasa NS3 se dedujo del hecho de que mutaciones en la proteasa NS3 del virus de la fiebre amarilla disminuyen la infectividad viral [T.J. Chambers y col., "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898-8902 (1990)]. Más recientemente, se ha demostrado que mutaciones en sitio activo de la proteasa NS3 de HCV podría eliminar completamente la infección por HCV en un modelo de chimpancé [C.M. Rice y col. "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-nontranslated region are essential for virus replication in vivo." J. Virol., 74(4) 2046-51 (2000)]. La serina proteasa NS3 de HCV también se considera esencial para la replicación viral como tal y su cofactor asociado, NS4A, ayuda al procesamiento de todas las enzimas virales. Este procesamiento parece ser análogo al realizado por la aspartil proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"). Además, el uso demostrado de inhibidores de la proteasa de VIH como agentes antivirales potentes en el ser humano demuestra que interrumpir una fase de procesamiento de la proteína proteasa en el ciclo vital del virus provoca agentes terapéuticamente activos. Por consiguiente, la enzima proteasa es una diana atractiva para el descubrimiento de fármacos.

Se han descritos varios inhibidores potenciales de proteasa de HCV. Las publicaciones PCT números WO 00/09558, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO98/46630, WO 98/17679 y WO 97/43310, la patente de Estados Unidos N° 5.990.276, M. Llinás-Brunet y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 1713-1718 (1998), W. Han y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 711-713 (2000), R. Dunsdon y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 1571-1579 (2000), M. Llinás-Brunet y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2267-2270 (2000), y S. LaPlante y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2271-2274 (2000) describen cada una inhibidores potenciales de proteasa NS3 de HCV. Desafortunadamente, no existen inhibidores de serina proteasa disponibles actualmente como agentes anti-HCV.

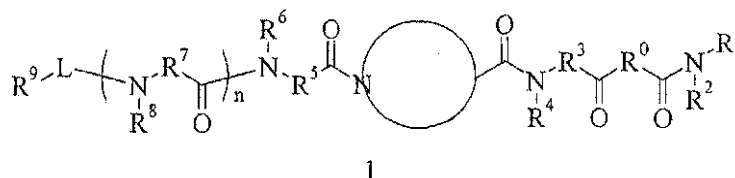
De hecho, no existen terapias anti-HCV excepto interferón- α , combinación interferón- α /ribavirina y más recientemente interferón- α pegilado. Las tasas de respuesta sostenida para las terapias de interferón- α e interferón- α /ribavirina, sin embargo, tienden a ser bajas (<50%) y los efectos secundarios mostrados por las terapias tienden a ser significativos y severos [M.A. Walker, "Hepatitis C Virus: an Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, 518-529 (1999); D. Moradpour y col., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C," Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, 1199-1202 (1999); H.L.A. Janssen y col., "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis," J. Hepatol., 21, 241-243 (1994); y P.F. Renault y col., "Side effects of alpha interferon", Seminars in Liver Disease 9, 273-277, (1989)]: Además, las terapias con interferón solamente inducen remisión a largo plazo en solamente una fracción (- 25%) de los casos [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, 279-288 (1994)]. Los problemas mencionados anteriormente con las terapias con interferón- α incluso han conducido al desarrollo y estudio clínico de compuestos pegilados de interferón- α derivatizado como agentes terapéuticos mejorados anti-HCV.

En vista de la actual situación respecto a los agentes terapéuticos anti-HCV, está claro que existe la necesidad de terapias más eficaces y que se toleren mejor.

Además, la síntesis de compuestos peptidomiméticos complejos se ha visto impedida durante mucho tiempo por la naturaleza no estereoselectiva de la mayoría de los procesos orgánicos sintéticos. Se sabe bien que la actividad terapéutica de los enantiómeros de compuestos peptidomiméticos varía ampliamente. Por lo tanto, es de gran beneficio proporcionar dichos procesos sintéticos estereoespecíficos.

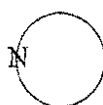
Intentos previos por sintetizar intermedios bicicloprolinato quiralmente específicos, útiles en la síntesis de los presentes inhibidores peptidomiméticos terapéuticos de proteasa han tenido el inconveniente de no ser enantioselectivos, o diastereoselectivos, o de implicar vías sintéticas largas, o de ser inadecuados para preparar grandes cantidades de producto. Por tanto, existe también la necesidad de recursos para preparar grandes cantidades de bicicloprolinatos de un modo diastereoselectivo y de una forma enantioméricamente enriquecida.

La presente invención se refiere a un compuesto peptidomimético de fórmula 1



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de un compuesto de este tipo, o su sal, en la que:

35 R^0 es un enlace o difluorometileno;
 R^1 es hidrógeno, grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
 R^2 y R^9 son cada uno independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
40 R^3 y R^5 son cada uno independientemente un metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido y R^7 es metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido, metileno de grupo cíclico inferior opcionalmente sustituido o (aril o heteroaril) metileno monocíclico opcionalmente sustituido;
 R^4 , R^6 , R^8 y R^{10} son cada uno independientemente es hidrógeno o grupo alifático opcionalmente sustituido;



45 es un azaheterociclilo monocíclico sustituido, en el que el grupo azaheterociclilo monocíclico está sustituido a través de un grupo de unión por al menos un sustituyente seleccionado entre arilo, heteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, aroilo o su análogo toxo, heteroaróilo

o su análogo tioxo, aroiloxi, heteroariloxi, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, ariltio, heteroariltio, arildiazo, heteroarildiazo, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$ en el que Y^1 , Y^2 e Y^3 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y^3 es alquilo, cicloalquilarilo o heteroarilo, o para cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, ciclicarbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcoxycarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o para cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros; y al menos uno de Y^1 e Y^2 es arilo o heteroarilo, en el que dicho grupo de unión es $-C(O)-$ o $-OC(O)-$, en el que:

(i) sustituyentes de grupo alifático significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclicloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, ciclicarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclicarboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxilo-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiloisoxazolilo, 3-hidroxilo-1-metilpirazolilo, alcoxycarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, ciclicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, ciclicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, ciclicarbonilo, ariltio, heteroariltio, ciclicarbonilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, metileno ($H_2C=$), oxo ($O=$), tioxo ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$, o $Y^3SO_2NY^1-$ en el que R^2 es tal como se define aquí, Y^1 e Y^2 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y^3 es alquilo, cicloalquilo arilo o heteroarilo, o para cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, ciclicarbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcoxycarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o para cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros;

(ii) sustituyentes de grupo de anillo significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclicloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, ciclicarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclicarboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), bioisómero de ácido, alcoxycarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, ciclicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, ciclicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, ciclicarbonilo, ariltio, heteroariltio, ciclicarbonilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, en el que Y^1 , Y^2 e Y^3 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o para cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, ciclicarbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcoxycarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o para cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros, o cuando un sistema de anillo está saturado o parcialmente saturado, los "sustituyentes de grupo de anillo" incluyen además, metileno ($H_2C=$), oxo ($O=$) y tioxo ($S=$);

(iii) arilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono;

(iv) cicloalquilo significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono;

(v) cicloalqueno significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono;

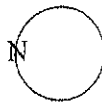
(vi) ciclicarbonilo significa cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclicilo o heterociclenilo;

(vii) heterociclicilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico saturado no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono;

(viii) heterociclenilo significa un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico o multicíclico no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno; y

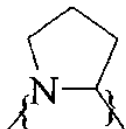
(ix) heteroarilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono.

L es -C(O)-, -OC(O)-, -NR¹⁰C(O)-, -S(O)₂- o -NR¹⁰S(O)₂; y
n es 0 o 1;
con la condición de que
cuando



5

es



10

sustituido, entonces L es -OC(O)- y R⁹ es un grupo alifático opcionalmente sustituido; o al menos uno de R³, R⁵ y R⁷ es etileno, sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido y en el que el etileno está además opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo alifático; o R⁴ es un grupo alifático opcionalmente sustituido;

15

cíclico es un sistema de anillo mono- o multicíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono; un sistema de anillo mono- o multicíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono; un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado no aromático de 3 a 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo; o un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado no aromático de 3 a 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono;

20

aromático es un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 10 átomos de carbono, o un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 5 a 14 en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo; grupos alifáticos opcionalmente sustituidos son alquilo, alquenilo o alquinilo, opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo alifático;

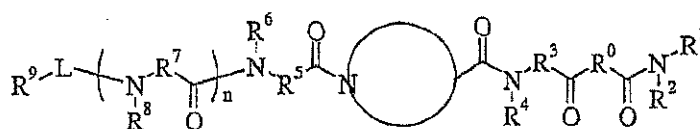
25

grupos cíclicos opcionalmente sustituidos son grupos cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o heterociclenilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo; grupos aromáticos opcionalmente sustituidos son grupos arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

30

grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo; grupos (1,1- o 1,2) heterociclileno opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) heterociclileno opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo.

También se describe un compuesto peptidomimético de fórmula 1



1

en la que:

35

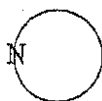
R⁰ es un enlace o difluorometileno;
R¹ es hidrógeno, grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;

40

R² y R⁹ son cada uno independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;

R³, R⁵ y R⁷ son cada uno independientemente (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (metileno opcionalmente sustituido o etileno opcionalmente sustituido), (1,1- o 1,2-) cicloalquileno opcionalmente sustituido o (1,1- o 1,2-) heterociclileno opcionalmente sustituido;

cada uno de R⁴, R⁶, R⁸ y R¹⁰ es independientemente hidrógeno o grupo alifático opcionalmente sustituido;



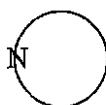
5 es azaheterociclilo monocíclico sustituido o azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido, o azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido en el que la insaturación se encuentra en el anillo distal con respecto al anillo que porta el resto $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O))_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ y al que el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$ está unido;

L es $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-NR^{10}S(O)_2-$; y

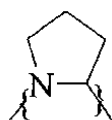
n es 0 o 1, o

10 una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal o su profármaco, con la condición de que

cuando

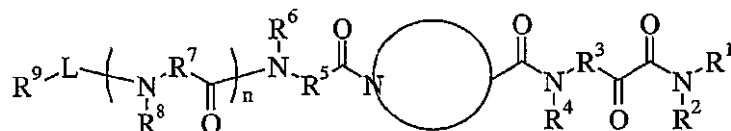


es



15 sustituido, entonces L es $-OC(O)-$ y R^9 es un grupo alifático opcionalmente sustituido, o al menos uno de R^3 , R^5 y R^7 es (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (etanodiilo opcionalmente sustituido), o R^4 es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural:



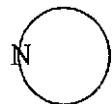
20 en la que:

R^1 es hidrógeno, grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;

25 R^2 y R^9 son cada uno independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;

R^3 , R^5 y R^7 son cada uno independientemente (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (metanodiilo opcionalmente sustituido o etanodiilo opcionalmente sustituido);

R^4 , R^6 , R^8 y R^{10} son cada uno independientemente es hidrógeno o grupo alifático opcionalmente sustituido



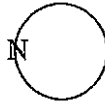
30 es azaheterociclilo monocíclico sustituido o azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido, o azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido en el que la insaturación se encuentra en el anillo distal con respecto al anillo que porta el resto $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O))_nN(R^6)-R^5-C(O)-N$ y al que el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$ está unido;

35 L es $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-NR^{10}S(O)_2-$; y

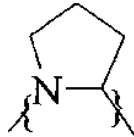
n es 0 o 1, o

una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal o su profármaco,

con la condición de que cuando



es

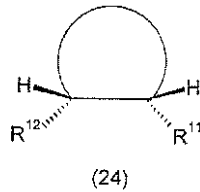


5

sustituido, entonces L es -OC(O)- y R⁹ es un grupo alifático opcionalmente sustituido, o al menos uno de R³, R⁵ y R⁷ es (grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido) (etanodiilo opcionalmente sustituido), o R⁴ es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

10 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, y el compuesto de la invención, para su uso en la inhibición de la VHC proteasa, o el tratamiento o la prevención de una infección por VHC en pacientes o un estado fisiológico en relación con la infección.

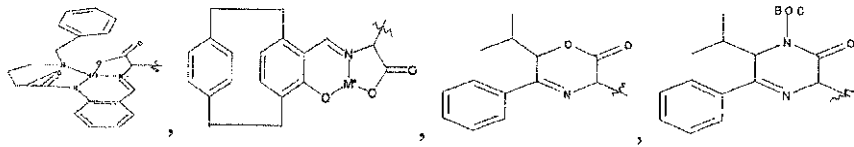
La invención también se refiere a un compuesto de fórmula 24



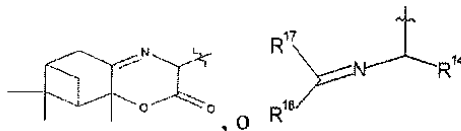
15 en la que:



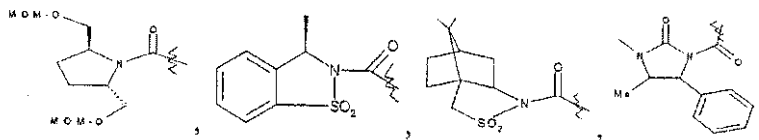
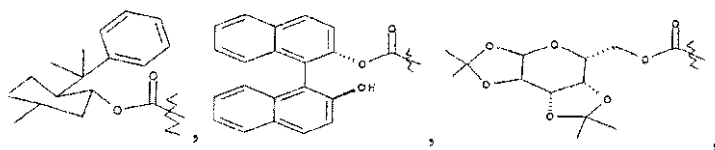
es ciclopentilo;
R¹¹ es -CO₂R¹³;
R¹² es un producto de adición de derivado de glicinimida imínica seleccionado entre el grupo de fórmulas



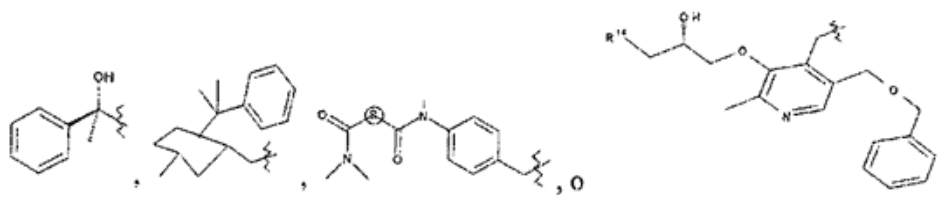
20



en las que: R¹⁴ es -CO₂R¹⁶, -CN;



- 5 o -CONR¹⁵R¹⁵;
 R¹⁵ es un grupo alifático;
 R¹⁶ es un grupo protector de ácido, arilo, o grupo alifático;
 R¹⁷ es arilo, grupo alifático,



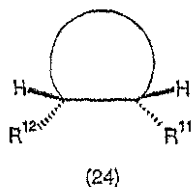
- R¹⁸ es hidrógeno, alquilo, o alquilitio; o arilo;
 R¹⁷ y R¹⁸ tomados junto con el carbono al que R¹⁷ y R¹⁸ están unidos forman



- 10 y $\text{\textcircled{S}}$ es una fase sólida; y
 R¹³ es un grupo protector de ácido o grupo alifático.

Los compuestos de la invención pueden prepararse usando un procedimiento estereoselectivo para preparar un compuesto de bicicloprolinato quiral que es un producto intermedio útil en la preparación de un compuesto de fórmula 1. El procedimiento sintético comprende las etapas de:

- 15 (a) escindir y ciclar un compuesto de fórmula 24



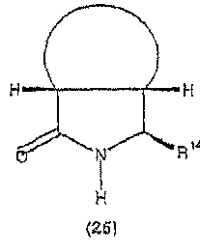
en la que



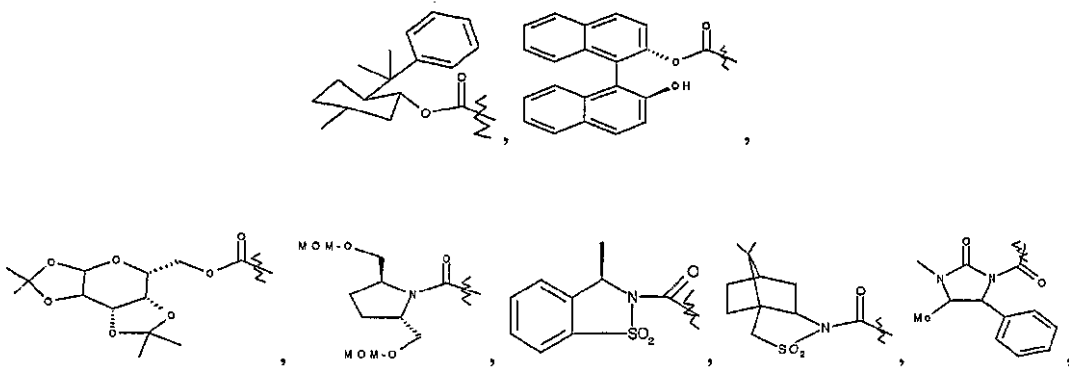
es cicloalquilo opcionalmente sustituido o arilcicloalquilo condensado opcionalmente sustituido;

- 20 R¹¹ es -CO₂R¹³;
 R¹² es un producto de adición de glicinimida imínica;
 R¹³ es un grupo protector de ácido o grupo alifático opcionalmente sustituido; bajo condiciones de

escisión y ciclación para formar un compuesto de fórmula 25

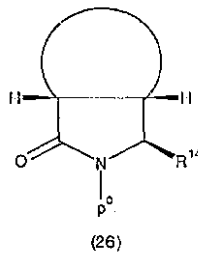


en la que: R^{14} es $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{16}$, $-\text{CN}$;



5 $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;
 R^{15} es un grupo alifático opcionalmente sustituido;
 R^{16} es un grupo protector de ácido, arilo opcionalmente sustituido, o grupo alifático opcionalmente sustituido; y

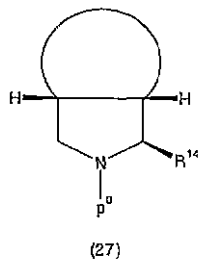
10 (b) proteger el nitrógeno del resto lactama en el compuesto de fórmula 25 con un grupo protector de amida para formar un compuesto de fórmula 26



en la que:

p^0 es un grupo protector de amida;
 R^{14} es tal como se describe en el presente documento; y

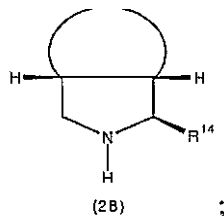
15 (c) reducir el compuesto de fórmula 26 bajo condiciones de reducción para formar un compuesto de fórmula 27



en la que:

p° y R^{14} son tal como se describe en el presente documento; y

(d) desproteger el compuesto de fórmula 27 bajo condiciones de desprotección para formar un compuesto de fórmula 28



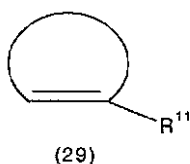
5

en la que:

R^{14} es tal como se describe en el presente documento.

La invención también se refiere al procedimiento sintético anterior que además comprende la etapa en la que el compuesto de fórmula 24 se prepara efectuando una adición de Michael con un compuesto de glicinimida imínica sobre un compuesto de fórmula 29

10



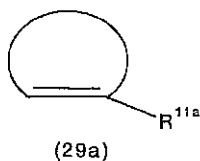
en la que:



es cicloalqueno opcionalmente sustituido o arilcicloalqueno condensado opcionalmente sustituido;

15 R^{11} es $-\text{CO}_2R^{13}$,
en el que:

el compuesto de fórmula 29 puede prepararse mediante la esterificación de un compuesto de fórmula 29a



en la que:



20

es cicloalqueno opcionalmente sustituido o arilcicloalqueno condensado opcionalmente sustituido;

R^{11a} es $-\text{CHO}$, $-\text{COR}^{15}$, $-\text{C}=\text{N}$, o $-\text{CONR}^{15}$; y

R^{15} es tal como se describe en el presente documento.

25 Cabe destacar que un experto en la materia sabría que la conversión de cetonas en ésteres puede lograrse, por ejemplo, mediante una reacción de Bayer-Villiger. La conversión de nitrilos y amidas en ésteres puede lograrse, por ejemplo, mediante hidrólisis acuosa seguido de esterificación adicional. La conversión de aldehídos en ésteres puede lograrse, por ejemplo, mediante oxidación del aldehído seguido de esterificación.

Otro aspecto de la invención es un compuesto de fórmula 1 en la que los sustituyentes se seleccionan entre una combinación de realizaciones preferentes o particulares tal como se define en el presente documento.

Otro aspecto de la invención es un compuesto de fórmulas 24-29 en las que los sustituyentes se seleccionan entre una combinación de realizaciones preferentes o particulares tal como se define en el presente documento.

5 Otro aspecto de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden, además de uno o más inhibidores de serina proteasa de HCV, uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Otro aspecto de la invención son usos de compuestos de la invención en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de uno o más inhibidores de serina proteasa de HCV; uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestre actividad anti-HCV; y/o uno o más compuestos que tengan actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestren actividad antiviral de HCV.

15 La invención también se refiere al uso de uno o más inhibidores de serina proteasa de HCV en combinación con uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestra actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, para preparar un medicamento para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente que lo necesite.

20 La presente invención también se refiere a un kit o embalaje farmacéutico para su uso en el tratamiento o prevención de infección por HCV en un paciente, en el que el kit o embalaje farmacéutico comprende una pluralidad de recipientes diferentes, en el que al menos uno de dichos recipientes contiene uno o más inhibidores de serina proteasa de HCV (solos o en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestra actividad anti-HCV, (solos o en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable) y, opcionalmente, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV (solos o en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV.

25 La cantidad del inhibidor o inhibidores de serina proteasa de HCV, interferón o interferones, o compuesto o compuestos anti-HCV en cualquiera de las aplicaciones anteriores puede ser una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad eficaz anti-HCV subclínica, o combinaciones de las mismas, siempre que la combinación final del inhibidor o inhibidores de serina proteasa de HCV, interferón o interferones, o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestra actividad anti-HCV, y/o compuesto o compuestos anti-HCV comprenda una cantidad farmacéuticamente eficaz de compuestos que sea eficaz en el tratamiento o prevención de infección por HCV en un paciente.

Breve descripción de los dibujos

30 Los aspectos, características y ventajas anteriores y otros, de la presente invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, todos los cuales se dan a modo de ilustración solamente, y no son limitantes de la presente invención, en que:

La Figura 1 muestra la inhibición de la acumulación de ARN del replicón HCV después de 48 horas de tratamiento de células que contienen replicón en comparación con Compuesto CU e interferón-alfa 2B, individualmente o en combinación.

35 La Figura 2 muestra gráficamente la concavidad de la isobol mostrada por compuestos usados en combinación que son antagonistas, aditivos y sinérgicos de acuerdo con los procedimientos de cálculo de sinergia de Greco, Park y Ruston ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327).

40 La Figura 3 muestra la relación geométrica entre α y la cantidad de curvatura en la isobol. Una isobol hipotética al nivel de efecto de $E = 50\%$ se presenta con isobol de línea recta que se esperaría en aditividad. M es el punto de inserción de la línea $y = x$ y la isobol hipotética. N es el punto de inserción de la línea $y = x$ y la isobol de línea recta. O es el origen (0,0). S da una medida de la cantidad de curvatura de la isobol, donde $S = ON/OM$. ON es la distancia desde O hasta N y OM es la distancia desde O hasta M. El parámetro α está relacionado con S por la ecuación $\alpha = 4(S^2 - S)$.

45 La Figura 4 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación CU e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 6 diluciones de cada compuesto en el Experimento 1.

La Figura 5 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación CU e interferón alfa-2A usando 6 diluciones de cada compuesto en el

Experimento 2.

La Figura 6 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para las combinaciones de compuesto de comparación CU e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 3.

5 La Figura 7 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación CU e interferón alfa-2A usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 4.

10 La Figura 8 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación CU e interferón ovino tau usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 5.

La Figura 9 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación EC e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 6.

15 La Figura 10 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación EC e interferón alfa-2A usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 7.

La Figura 11 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación CU e interferón beta usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 8.

20 La Figura 12 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de compuesto de comparación EP e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 9.

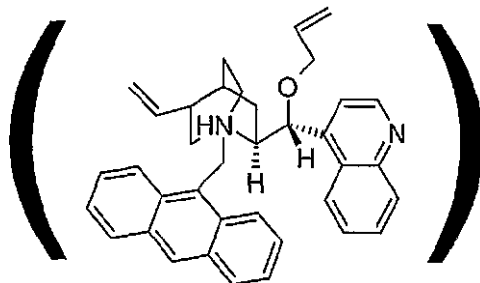
25 La Figura 13 muestra los cálculos de isobol usando el procedimiento de Greco y col., *supra*, para la combinación de Ribavirina e interferón alfa-2B (Schering-Plough) usando 8 diluciones de cada compuesto en el Experimento 10.

La Figura 14 muestra la inhibición de la acumulación de ARN del replicón HCV causada por tratamiento de células de replicón con (A) Ribavirina sola o (B) interferón alfa-2B solo. En ambos paneles, se muestra la inhibición medida así como la inhibición corregida para la citotoxicidad de los compuestos.

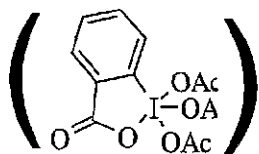
Descripción detallada de la invención

30 Tal como se usa en lo que antecede, y a través de la totalidad de la descripción de la invención, ha de entenderse que las siguientes abreviaturas, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:-

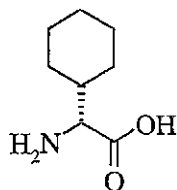
<u>Designación</u>	<u>Reactivo o Fragmento</u>
ACN	acetoniitrilo
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
BOC o Boc	carbamato de terc-butilo
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris (dimetilamino)fosfonio
n-Bu ₃ SnH	hidruro de tri-n-butilestaño
t-Bu	terc-butilo
Cbz	carbamato de bencilo
PTC quiral	catalizador de transferencia de fase quiral



DAST	trifluoruro de (dietilamino)azufre (Et ₂ NSF ₃)
DCC	diciclocarbodiimida
DCM	diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
DIBAL-H	hidruro de diisobutilaluminio
DIC	1,3-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-(N,N-dimetilamino)piridina
reactivo de DMP	reactivo de peryodinano de Dess-Martin



DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EA	análisis elemental
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl
eq	equivalente o equivalentes
Et	Etilo
Et ₂ O	éter dietílico
EtOH	etanol
EtOAc	acetato de etilo
Et ₃ Si	trietilsilano
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo



H-Chg-OH	
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HOSu	N-hidroxisuccinamida
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
LAH	anhídrido de aluminio y litio
Me	metilo
Mel	yoduro de metilo
MeOH	metanol
MeOC(O)Cl	cloroformiato de metilo
MOMCl	metoximetilcloruro
MOM	metoximetilo
MS	espectroscopía de masas
NaBH ₄	borohidruro de sodio
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	tartrato de sodio
NMP	N-metil pirrolidinona
RMN	resonancia magnética nuclear
P-	enlace de polímero
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio
TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]-dec-5-eno
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta presión - fase inversa
TBSCl	cloruro de terc-butildimetilsililo
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
Tf ₂ O	triflato anhídrido
THF	tetrahidrofurano
THP	tetrahidropirano
TLC	cromatografía de capa fina

Tal como se usa en lo que antecede, y a través de la totalidad de la descripción de la invención, ha de entenderse

heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo e Y^1Y^2NCO- . Los sustituyentes de grupo alifático polar no ácido son hidroxilo, oxo (O=), tioxo (S=), acilo o su análogo tioxo, ciclicarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo, heteroarilo o su análogo tioxo, alcoxicarbonilo, ciclicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, aciloxi, ciclicarboniloxi, aroiloxi, heteroariloxi, alquilsulfonilo, ciclicarboniloxi, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, ciclicarboniloxi, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, tiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$. Los grupos alifáticos ejemplares que portan un sustituyente de grupo alifático incluyen metoximathoxi, metoxietoxi, etoxietoxi, (metoxi-, benciloxi-, fenoxi-, o etoxi-)carbonil(metilo o etilo), benciloxicarbonilo, piridilmetiloxi-carbonilmetilo, metoxietilo, etoximetilo, n-butoximetilo, ciclopentilmetiloxietilo, fenoxipropilo, fenoxialilo, trifluorometilo, ciclopropil-metilo, ciclopentilmetilo, carboxi(metilo o etilo), 2- fenetenilo, benciloxi, 1- o 2-naftil-metoxi, 4-piridil-metiloxi, benciloxietilo, 3-benciloxialilo, 4-piridilmetil-oxietilo, 4-piridilmetil-oxialilo, bencilo, 2-fenetilo, naftilmetilo, estirilo, 4-fenil-1,3-pentadienilo, fenilpropinilo, 3-fenilbut-2-inilo, pirid-3-ilacetilenilo y quinolin-3-ilacetilenilo, 4-piridil-etinilo, 4-piridilvinilo, tieniletinilo, piridiletinilo, imidazolil-etenilo, piraziniletinilo, piridilpentenilo, piridilhexenilo y piridilheptenilo, tienil-metilo, piridilmetilo, imidazolilmetilo, pirazinilmetilo, tetrahidropiranilmetilo, tetrahidropiranil-metiloximetilo y similares.

"Acilo" significa un grupo H-CO- o (alifático o ciclicarbonil)-CO- en el que el grupo alifático es tal como se describe en el presente documento. Los acilos preferidos contienen un alquilo inferior. Los grupos acilo ejemplares incluyen formilo, acetilo, propanoilo, 2-metilpropanoilo, butanoilo, palmitoilo, acrililo, propinoilo, ciclohexilcarbonilo y similares.

"Alquenoilo" significa un grupo alquenoil-CO- en el que el alquenoilo es tal como se define en el presente documento.

"Alquenoilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado, que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquenoilo preferentes tienen de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior, tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquenoilo lineal. "Alquenoilo inferior" significa de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena, que puede ser lineal o ramificada. Los grupos alquenoilo ejemplares incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, n-pentenilo, heptenilo, octenilo, ciclohexilbutenilo, decenilo y similares. "Alquenoilo sustituido" significa un grupo alquenoilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alifático" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. Sustituyentes de grupo alifático de alquenoilo ejemplares incluyen grupos halo o cicloalquilo.

"Alquenoiloxi" significa un grupo alquenoil-O- en el que el grupo alquenoilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos alquenoiloxi ejemplares incluyen aliloxi, 3-buteniloxi y similares.

"Alcoxi" significa un grupo alquil-O- en el que el grupo alquilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos alcoxi ejemplares incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, heptoxi y similares.

"Alcoxicarbonilo" significa un grupo alquil-O-CO-, en el que el grupo alquilo es tal como se define en el presente documento. Los grupos alcoxicarbonilo ejemplares incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo y similares.

"Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado, que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferentes tienen de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena, más preferente es alquilo inferior tal como se define en el presente documento. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior, tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquilo lineal. "Alquilo inferior" significa de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena, que puede ser lineal o ramificada. "Alquilo sustituido" significa un grupo alquilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alifático" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se define en el presente documento.

"Alquilsulfonilo" significa un grupo alquil-SO- en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido en lo que antecede. Los grupos preferentes son aquellos en los que el grupo alquilo es alquilo inferior.

"Alquilsulfonilo" significa un grupo alquil-SO₂- en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido en lo que antecede. Los grupos preferentes son aquellos en los que el grupo alquilo es alquilo inferior.

"Alquilsulfonilcarbamoilo" significa un grupo alquil-SO₂-NH-C(=O)- en el que el grupo alquilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos alquilsulfonilcarbamoilo preferentes son aquellos en los que el grupo alquilo es alquilo inferior.

"Alquilio" significa un grupo alquil-S- en el que el grupo alquilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos alquilio ejemplares incluyen metiltio, etiltio, i-propiltio y heptiltio.

"Alquinilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado, que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo preferidos tienen de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior, tales como metilo, etilo o propilo están unidos a la cadena alquinilo lineal. "Alquinilo inferior" significa de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena, que puede ser lineal o ramificada. El grupo alquinilo puede estar sustituido por uno o más halo. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo, octinilo, decinilo y similares. "Alquinilo sustituido" significa alquinilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alifático" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se define en el presente documento.

"Grupo protector de amina" significa un grupo retirable con facilidad que se sabe en la técnica que protege un resto nitrógeno de un grupo amino o amida frente una reacción no deseable durante los procedimientos de síntesis y que es selectivamente retirable. El uso de grupos protectores de amina/amida es bien conocido en la técnica para grupos protectores frente una reacción no deseables durante un procedimiento de síntesis y se conocen muchos de tales grupos protectores, por ejemplo, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1991). Grupo protector de amina/amida también incluye "grupo protector de amina/amida lábil frente a ácido" y "grupo protector de amina/amida lábil frente a hidrogenación". Los grupos protectores de amina/amida ejemplares son acilo, incluyendo formilo, acetilo, cloroacetilo, tricloroacetilo, o-nitrophenilacetilo, o-nitrofenoxi-acetilo, trifluoroacetilo, acetoacetilo, 4-clorobutirilo, isobutirilo, o-nitrocinnamoilo, picolinoilo, acilisotiocianato, aminocaproilo, benzoilo y similares, y aciloxi incluyendo metoxi-carbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 2,2,2-trifluoroetoxicarbonilo, 2-trimetilsililetoxi-carbonilo, viniloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo (BOC), 1,1-dimetil-propiniloxicarbonilo, benciloxicarbonilo (CBZ), p-nitrobenciloxicarbonilo, 2,4-dicloro-benciloxicarbonilo y similares.

"Grupo protector de amida" significa un grupo retirable con facilidad que se sabe en la técnica que protege un resto nitrógeno de un grupo amida frente una reacción no deseable durante los procedimientos de síntesis y que es selectivamente retirable después de su conversión en la amina. El uso de grupos protectores de amida es bien conocido en la técnica para grupos protectores frente una reacción no deseables durante un procedimiento de síntesis y se conocen muchos de tales grupos protectores, por ejemplo, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1991). Grupo protector de amida también incluye "grupo protector de amida lábil frente a ácido" y "grupo protector de amida lábil frente a hidrogenación". Los grupos protectores de amida ejemplares son o-nitrocinnamoilo, picolinoilo, aminocaproilo, benzoilo y similares, y aciloxi incluyendo metoxi-carbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 2,2,2-trifluoroetoxicarbonilo, 2-trimetilsililetoxicarbonilo, viniloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, f-butiloxicarbonilo (BOC), 1,1-dimetil-propiniloxicarbonilo, benciloxicarbonilo (CBZ), p-nitrobenciloxicarbonilo, 2,4-dicloro-benciloxicarbonilo y similares.

"Aminoácido" significa un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en aminoácidos naturales y no naturales como se define en el presente documento. Aminoácido también pretende incluir aminoácidos que tienen estereoquímica L o D en el carbono- α . Los aminoácidos preferidos son aquellos que poseen un grupo α -amino. Los aminoácidos pueden ser neutros, positivos o negativos dependiendo de los sustituyentes en la cadena lateral. "Aminoácido neutro" significa un aminoácido que contiene sustituyentes de cadena lateral no cargados. Aminoácidos neutros ejemplares incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina y cisteína. "Aminoácido positivo" significa un aminoácido en que los sustituyentes de cadena lateral están cargados positivamente a pH fisiológico. Aminoácidos positivos ejemplares incluyen lisina, arginina e histidina. "Aminoácido negativo" significa un aminoácido en que los sustituyentes de cadena lateral albergan una carga negativa neta a pH fisiológico. Aminoácidos negativos ejemplares incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Aminoácidos preferidos son α -aminoácidos. Aminoácidos naturales ejemplares son isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. "Aminoácido no natural" significa un aminoácido para el cual no existe codón de ácido nucleico. Aminoácidos no naturales ejemplares incluyen, por ejemplo, los isómeros de los α -aminoácidos naturales como se ha indicado anteriormente, Aib (ácido aminobutírico), β Aib (3-amino-ácido isobutírico), Nva (norvalina), β -Ala, Aad (ácido 2-aminoadípico), β Aad (ácido 3-aminoadípico), Abu (ácido 2-aminobutírico), Gaba (ácido γ -aminobutírico), Acp (ácido 6-aminocapróico), Dbu (ácido 2,4-diaminobutíricod), ácido α -aminopimélico, TMSA (trimetilsilil-Ala), alle (alo-isoleucina), Nle (norleucina), *terc*-Leu, Cit (citrulina), Orn, Dpm (ácido 2,2'-diaminopimélico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropiónico), α -o β -Nal, Cha (ciclohexil-Ala), hidroxiprolina, Sar (sarcosina), y similares; aminoácidos cíclicos; aminoácidos N^a-alquilados tales como MeGly (N^a-metilglicina), EtGly (N^a-etilglicina) y EtAsn (N^a-etilasparagina); y aminoácidos en que el carbono- α alberga dos sustituyentes de cadena lateral. Los nombres de los aminoácidos naturales y no naturales y los restos de los mismos usados en el presente documento siguen las convenciones de nomenclatura sugeridas por la IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry y la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature expuesto en "Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974) " *Biochemistry*, 14(2), (1975). En la medida en que los nombres y abreviaturas de

aminoácidos y restos de los mismos empelados en la presente memoria y reivindicaciones adjuntas difieren de los indicados, se aclararán los diferentes nombres y abreviaturas.

5 "Grupo protector de aminoácido" significa un grupo que protege un resto amina o del aminoácido u otro resto reactivo en la cadena lateral de un aminoácido, por ejemplo, hidroxilo o tiol. Por ejemplos de "derivados protegidos correspondientes" de cadenas laterales de aminoácido, véase T. W. Green y P. G. M. Wuts en "*Protective Groups in Organic Chemistry*" John Wiley and Sons, 1991. Los grupos de protección para un grupo ácido en un aminoácido se describen en el presente documento, por ejemplo en las secciones "grupo funcional ácido" y "grupo protector de ácido lábil frente a hidrogenación". Los grupos de protección para un grupo amina en un aminoácido se describen en el presente documento, por ejemplo en las secciones "grupo protector de amina", "grupo protector de amina lábil frente a ácido" y "grupo protector de amina lábil frente a hidrogenación".

"Residuo de aminoácido" significa las unidades de aminoácido individuales incorporadas en el compuesto de la invención.

15 "Cadena lateral de aminoácido" significa el sustituyente hallado en el carbono entre los grupos amino y carboxi en α -aminoácidos. Las cadenas laterales de α -aminoácido ejemplares incluyen isopropilo, metilo, y carboximetilo para valina, alanina, y ácido aspártico, respectivamente.

"Equivalente de aminoácido" significa un aminoácido que puede sustituir a otro aminoácido en los péptidos de acuerdo con la invención sin pérdida apreciable alguna de función. Al realizar tales cambios, las sustituciones de aminoácidos similares se realizan sobre la base de la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral, por ejemplo en lo que respecta al tamaño, la carga, hidrofiliidad, hidropaticidad e hidrofobicidad tal como se describe en el presente documento.

"Grupo aromático" significa arilo o heteroarilo tal como se define en el presente documento. Los grupos aromáticos ejemplares incluyen fenilo, halo fenilo sustituido, azaheteroarilo y similares.

"Aroilo" significa un grupo aril-CO- en el que el grupo arilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos aroilo ejemplares incluyen benzoilo, 1- y 2-naftoilo y similares.

25 "Arilo" significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Englobados por arilo se encuentran arilcicloalqueno condensado, arilcicloalquilo condensado, arilheterociclenilo condensado y arilheterociclenilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto arilo de los mismos. El arilo está opcionalmente sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se define en el presente documento. Los grupos arilo ejemplares incluyen fenilo o naftilo, o fenilo sustituido o naftilo sustituido. "Arilo sustituido" significa un grupo arilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento.

35 "Arildiazo" significa un grupo aril-diazo en el que los grupos arilo y diazo son tal como se define en el presente documento.

"Arileno" significa un grupo arilo bivalente opcionalmente sustituido 1,2-, 1,3-, 1,4-, , en el que el grupo arilo es tal como se define en el presente documento. Los grupos arileno ejemplares incluyen fenileno opcionalmente sustituido, naftileno e indanileno. Un arileno particular es fenileno opcionalmente sustituido. "Arileno sustituido" significa un grupo arileno como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento.

"Ariloxi" significa un grupo aril-O- en el que el grupo arilo es tal como se define en el presente documento. Los grupos ariloxi ejemplares incluyen fenoxi y 2-naftiloxi.

45 "Ariloxicarbonilo" significa un grupo aril-O-CO- en el que el grupo arilo es tal como se define en el presente documento. Los grupos ariloxi-carbonilo ejemplares incluyen fenoxicarbonilo y naftoxicarbonilo.

"Arilsulfonilo" significa un grupo aril-SO₂- en el que el grupo arilo es tal como se define en el presente documento.

"Arilsulfonilcarbamoilo" significa un grupo aril-SO₂-NH-C(=O)- en el que el grupo arilo es tal como se describe en el presente documento. Un grupo arilsulfonilcarbamoilo ejemplares es fenilsulfonilcarbamoilo.

"Arilsulfonilo" significa un grupo aril-SO- en el que el grupo arilo es tal como se define en el presente documento.

50 "Ariltio" significa un grupo aril-S- en el que el grupo arilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos ariltio ejemplares incluyen feniltio y naftiltio.

"Átomo de nitrógeno básico" significa un átomo de nitrógeno sp² o sp³ hibridado que tiene un par no enlazado de electrones que es capaz de protonarse. Los átomos de nitrógeno básicos ejemplares incluyen grupos imino

opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido y amidino opcionalmente sustituido.

"Carboxi" significa un grupo HO(O)C-(ácido carboxílico).

5 "Agente de acoplamiento" significa un compuesto que reacciona con el resto hidroxilo de un resto carboxilo, volviendo de este modo al mismo susceptible de ataque nucleófilo. Los agentes de acoplamiento ejemplares incluyen DIC, EDCI, DCC y similares.

10 "Cicloalquenilo" significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Englobados por cicloalquenilo se encuentran arilcicloalquenilo condensado y heteroarilcicloalquenilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto cicloalquenilo de los mismos. Los tamaños de anillo preferentes de los anillos del sistema de anillo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". "Cicloalquenilo sustituido" significa un grupo cicloalquenilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. Los cicloalquenos monocíclicos ejemplares incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y similares. Un cicloalquenilo multicíclico ejemplares es norbornenilo.

20 "Cicloalquilo" significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferentes de los anillos del sistema de anillo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". Englobados por cicloalquilo se encuentran arilcicloalquilo condensado y heteroarilcicloalquilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto cicloalquilo de los mismos. "Cicloalquilo sustituido" significa un grupo cicloalquilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. Los cicloalquilos monocíclicos ejemplares incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Los cicloalquilos multicíclicos ejemplares incluyen 1-decalina, norbornilo, adamant-(1- o 2-)ilo y similares.

30 "Cicloalquilenilo" significa un grupo cicloalquilo bivalente tal como se define en el presente documento que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferentes del cicloalquilenilo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". Los puntos de unión en el grupo cicloalquilenilo incluyen patrones de unión 1,1-, 1,2-, 1,3-, o 1,4- y, donde sea aplicable, la relación estereoquímica de los puntos de unión es o bien cis o bien trans. Los grupos cicloalquilenos ejemplares incluyen (1,1-, 1,2- o 1,3-) ciclohexileno y (1,1- o 1,2-) ciclopentileno. "Cicloalquilenilo sustituido" significa un grupo cicloalquilenilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento.

35 "Cíclico" o "Ciclilo" significa cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o heterociclenilo tal como se define en el presente documento. El término "inferior" tal como se usa en conexión con el término cíclico es el mismo que se ha indicado en el presente documento en lo que respecta al cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o heterociclenilo.

40 "Ciclioxi" significa un grupo cicliil-O- en el que el grupo ciclilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos cicloalcoxi ejemplares incluyen ciclopentiloxi, ciclohexiloxi, quinuclidiloxi, pentametileno sulfideoxi, tetrahidropiraniloxi, tetrahidrotiofeniloxi, pirrolidiniloxi, tetrahidrofuraniloxi o 7-oxabicyclo[2.2.1]heptaniloxi, hidroxitetrahidropiraniloxi, hidroxil-7-oxabicyclo[2.2.1]heptaniloxi y similares.

"Ciclisulfenilo" significa grupo cicliil-S(O)- en el que el grupo ciclilo es tal como se describe en el presente documento.

45 "Ciclisulfonilo" significa un grupo cicliil-S(O)₂- en el que el grupo ciclilo es tal como se describe en el presente documento.

"Ciclitio" significa un grupo cicliil-S- en el que el grupo ciclilo es tal como se describe en el presente documento.

"Diazo" significa un radical -N=N- bivalente.

50 "Resto desplazable" significa un grupo que, donde esté asociado con L tal como se define en el presente documento, puede ser objeto de desplazamiento por ataque nucleófilo por un resto amina mono- o di-sustituida con o sin presencia de un agente que facilite dicho ataque, por ejemplo, agente de acoplamiento. Restos desplazables ejemplares incluyen hidroxil, oxil alifático, halo, N-oxisuccinimida, aciloxi y similares.

"Cantidad efectiva" es significa una cantidad de un compuesto/composición de acuerdo con la presente invención efectiva en la producción del efecto terapéutico deseado.

"Arlcicloalquenilo condensado" significa un arilo condensado y cicloalquenilo tal como se define en el presente documento. Los arilcicloalquenilos condensados preferentes son aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el cicloalquenilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arilcicloalquenilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. "Arlcicloalquenilo condensado sustituido" significa un grupo arilcicloalquenilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. Los arilcicloalquenilo condensado ejemplares incluyen 1,2-dihidronaftileno, indeno y similares.

"Arlcicloalquilo condensado" significa un arilo condensado y cicloalquilo como se han definido en el presente documento. Los arilcicloalquilos condensados preferentes son aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el cicloalquilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arilcicloalquilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. "Arlcicloalquilo condensado sustituido" significa un grupo arilcicloalquilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. Los arilcicloalquilo condensado ejemplares incluye 1,2,3,4-tetrahidro-naftileno y similares.

"Arlheterociclenilo condensado" significa un arilo condensado y heterociclenilo tal como se define en el presente documento. Los arilheterociclenilos condensados preferentes son aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el heterociclenilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arilheterociclenilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heterocicleno del arilheterociclenilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Arlheterociclenilo condensado sustituido" significa un grupo arilheterociclenilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un arilheterociclenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heterociclenilo del arilheterociclenilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los arilheterociclenilo condensado ejemplares incluyen 3H-indolinilo, 1H-2-oxoquinolilo, 2H-1-oxoisoquinolilo, 1,2-dihidroquinolinilo, 3,4-dihidroquinolinilo, 1,2-dihidroisoquinolinilo, 3,4-dihidroisoquinolinilo y similares.

"Arlheterociclilo condensado" significa un arilo condensado y heterociclilo tal como se define en el presente documento. Los arilheterociclilos condensados preferentes son aquellos en los que el arilo de los mismos es fenilo y el heterociclilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un arilheterociclilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heterociclo del arilheterociclilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo de anillo. "Arlheterociclilo condensado sustituido" significa un grupo arilheterociclilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un arilheterociclilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heterociclilo del arilheterociclilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los sistemas de anillo de arilheterociclilo condensado ejemplares incluyen indolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, 1H-2,3-dihidroisoindol-2-ilo, 2,3-dihidrobenz[f]isoindol-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[g]-isoquinolin-2-ilo y similares.

"Heteroarilcicloalquenilo condensado" significa un heteroarilo y cicloalquenilo condensado tal como se define en el presente documento. Los heteroarilcicloalquenilos condensados preferentes son aquellos en los que el heteroarilo de los mismos es fenilo y el cicloalquenilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroaril-cicloalquenilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heteroarilo del heteroarilcicloalquenilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Heteroarilcicloalquenilo condensado sustituido" significa un grupo heteroarilcicloalquenilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilcicloalquenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno de la porción de heteroarilo del heteroarilcicloalquenilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido correspondiente. Los heteroarilcicloalquenilo condensado ejemplares incluyen 5,6-dihidroquinolilo, 5,6-dihidroisoquinolilo, 5,6-dihidroquinoxalinilo, 5,6-dihidroquinazolinilo, 4,5-dihidro-1H-benzoimidazolilo, 4,5-di-hidrobenzoxazolilo y similares.

"Heteroarilcicloalquilo condensado" significa un heteroarilo y cicloalquilo condensado tal como se define en el presente documento. Los heteroarilcicloalquilos condensados preferentes son aquellos en los que el heteroarilo de los mismos consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el cicloalquilo consiste en

de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilcicloalquilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heteroarilo del heteroarilcicloalquilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Heteroarilcicloalquilo condensado sustituido" significa un grupo heteroarilcicloalquilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilcicloalquilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno de la porción de heteroarilo del heteroarilcicloalquilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido correspondiente. Los heteroarilcicloalquilo condensado ejemplares incluyen 5,6,7,8-tetrahidroquinolinilo, 5,6,7,8-tetra-hidroisoquinolinilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinoxalinilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinazolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzoimidazolilo, 4,5,6,7-tetrahidrobenzoxazolilo, 1H-4-oxa-1,5-diazanaftalen-2-onilo, 1,3-dihidroimidazol-[4,5]-piridin-2-onilo y similares.

"Heteroarilheterociclenilo condensado" significa un heteroarilo y heterociclenilo condensado tal como se define en el presente documento. Los heteroarilheterociclenilos condensados preferentes son aquellos en los que el heteroarilo de los mismos consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el heterociclenilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilheterociclenilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heteroarilo o heterociclenilo del heteroarilheterociclenilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Heteroarilheterociclenilo condensado sustituido" significa el grupo heteroarilheterociclenilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilheterociclenilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heteroarilo del heteroarilheterociclenilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido correspondiente. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heteroarilo o heterociclenilo del heteroarilheterociclenilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los heteroarilheterociclenilo condensado ejemplares incluyen 7,8-dihidro[1,7]naftiridinilo, 1,2-dihidro[2,7]-naftiridinilo, 6,7-dihidro-3H-imidazo[4,5-c]piridilo, 1,2-dihidro-1,5-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,6-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,7-naftiridinilo, 1,2-dihidro-1,8-naftiridinilo, 1,2-dihidro-2,6-naftiridinilo y similares.

"Heteroarilheterociclilo condensado" significa un heteroarilo y heterociclilo condensado tal como se define en el presente documento. Los heteroarilheterociclicos condensados preferentes son aquellos en los que el heteroarilo de los mismos consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo y el heterociclilo consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Un heteroarilheterociclilo condensado como una variable puede enlazarse a través de cualquier átomo del sistema de anillo del mismo capaz de tal cosa. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes de la porción de heteroarilo o heterociclilo del heteroarilheterociclilo condensado define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Heteroarilheterociclilo condensado sustituido" significa un grupo heteroarilheterociclilo condensado tal como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heteroarilheterociclilo condensado puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heteroarilo del heteroarilheterociclilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido correspondiente. El átomo de nitrógeno o de azufre de la porción de heteroarilo o heterociclilo del heteroarilheterociclilo condensado también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los heteroarilheterociclilo condensado ejemplares incluyen 2,3-dihidro-1H-pirrol[3,4-b]quinolin-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[b][1,7]naftiridin-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidrobenz[b][1,6]naftiridin-2-ilo, 1,2,3,4-tetra-hidro-9H-pirido[3,4-b]indol-2-ilo, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido[4,3-b]indol-2-ilo, 2,3-dihidro-1H-pirrol[3,4-b]indol-2-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[3,4-b]indol-2-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[4,3-b]indol-3-ilo, 1H-2,3,4,5-tetrahidroazepino[4,5-b]indol-2-ilo, 5,6,7,8-tetrahidro[1,7]naftiridilo, 1,2,3,4-tetrahidro[2,7]naftiridilo, 2,3-dihidro[1,4]dioxino[2,3-b]piridilo, 2,3-dihidro-[1,4]dioxino[2,3-b]piridilo, 3,4-dihidro-2H-1-oxa[4,6]diazanaftalenilo, 4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridilo, 6,7-dihidro [5,8]diazanaftalenilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,5]-naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,6]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro [1,7]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro[1,8]naftiridinilo, 1,2,3,4-tetra-hidro[2,6]naftiridinilo y similares.

"Halo" significa fluoro, cloro, bromo, o yodo. Son preferentes fluoro, cloro o bromo, y son más preferentes fluoro o cloro.

"Heteroaróilo" significa un grupo heteroaril-CO- en el que el grupo heteroarilo es tal como se describe en el presente documento. Los grupos heteroaróilo ejemplares incluyen tiofenoilo, nicotinoilo, pirrol-2-ilcarbonilo, 1- y 2-naftoilo, piridinoilo y similares. "

"Heteroarilo" significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o

elementos distintos de carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferentemente el sistema de anillo incluye 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferentes de los anillos del sistema de anillo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. Englobados por heteroarilo se encuentran heteroarilcicloalqueno condensado, heteroarilcicloalquilo condensado, heteroarilheterociclenilo condensado y heteroarilheterociclilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto heteroarilo de los mismos. "Heteroarilo sustituido" significa un grupo heteroarilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes del heteroarilo define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. Un átomo de nitrógeno de un heteroarilo puede ser un átomo de nitrógeno básico y también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido correspondiente. Los grupos heteroarilo y heteroarilo sustituidos ejemplares incluyen pirazinilo, tienilo, isotiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, furazanilo, pirrolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, piridazinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[2,1-b]tiazolilo, benzofurazanilo, azaindolilo, benzoimidazolilo, benzotienilo, tienopiridilo, tienopirimidilo, pirrolopiridilo, imidazopiridilo, benzoazaindolilo, 1,2,4-triazinilo, benzotiazolilo, furanilo, imidazolilo, indolilo, indolizínilo, isoxazolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, pirazinilo, piridazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo y similares. Un grupo heteroarilo preferente es pirazinilo.

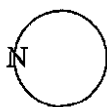
"Heteroarildiazo" significa un grupo heteroarilo -azo- en el que los grupos heteroarilo y azo son tal como se define en el presente documento.

"Heteroarilidilo" significa un radical bivalente obtenido a partir de un heteroarilo, en el que el heteroarilo es tal como se describe en el presente documento. Un radical heteroarildiilo ejemplares es piridinadiilo opcionalmente sustituido.

"Heteroarilsulfonilcarbamoilo" significa un grupo heteroaril-SO₂-NH-C(=O)- en el que el grupo heteroarilo es tal como se describe en el presente documento.

"Heterociclenilo" significa un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico o multicíclico no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre átomos, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno. Preferentemente, el anillo incluye 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferentes de los anillos del sistema de anillo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". Englobados por heterociclenilo se encuentran arilheterociclenilo condensado y heteroarilheterociclenilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto heterociclenilo de los mismos. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes del heterociclenilo define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente, respectivamente, como un átomo del anillo. "Heterociclenilo sustituido" significa un grupo heterociclenilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heterociclenilo puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre del heterociclenilo también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los grupos azaheterociclenilo monocíclicos ejemplares incluyen 1,2,3,4-tetrahidropiridina, 1,2-dihidropiridilo, 1,4-dihidropiridilo, 1,2,3,6-tetra-hidropiridina, 1,4,5,6-tetrahidro-pirimidina, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 2-imidazolinilo, 2-pirazolinilo y similares. Los grupos oxaheterociclenilo ejemplares incluyen 3,4-dihidro-2H-pirano, dihidrofurano, y fluorodihidrofuranilo. Un grupo oxaheterociclenilo multicíclico ejemplares es 7-oxabicyclo[2.2.1]heptenilo. Los anillos de tiaheterociclenilo monocíclico ejemplares incluyen dihidrotiofenilo y dihidrotiopiranilo.

"Heterociclilo" significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico saturado no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferentemente, el sistema de anillo contiene de 1 a 3 heteroátomos. Los tamaños de anillo preferentes de los anillos del sistema de anillo incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". Englobados por heterociclilo se encuentran arilheterociclilo condensado y heteroarilheterociclilo condensado tal como se define en el presente documento cuando se enlazan a través del resto heterociclilo de los mismos. La designación del aza, oxa o tia como un prefijo antes del heterociclilo define que al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre se encuentra presente respectivamente como un átomo del anillo. "Heterociclilo sustituido" significa un grupo heterociclilo como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. El átomo de nitrógeno de un heterociclilo puede ser un átomo de nitrógeno básico. El átomo de nitrógeno o de azufre del heterociclilo también puede oxidarse opcionalmente para dar el N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido correspondiente. Los anillos de heterociclilo monocíclico ejemplares incluyen piperidilo, pirrolidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolidinilo, 1,3-dioxolanilo, 1,4-dioxanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.



como azaheterociclilo monocíclico sustituido está sustituido directamente o a través de un ligador por al menos un sustituyente es decir, o engloba, o está sustituido con un grupo aromático tal como se define en el presente documento; por ejemplo arilo, heteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aroiloxi, heteroaroiloxi, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, arilsulfínilo, heteroarilsulfínilo, ariltio, heteroariltio, arildiazo, heteroarildiazo, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$ en el que al menos uno de Y^1 e Y^2 es, engloba o está sustituido con un resto arilo o heteroarilo. Los ligadores preferentes incluyen $-C(O)-$, $-OC(O)-$, alquilo inferior, alcoxi inferior, alqueno inferior, $-O-$, $-S-$, $-C(O)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NR^{80}-$, en el que R^{80} es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heteroarilo. Los ligadores particularmente preferentes son $-C(O)-$ y $-OC(O)-$. "Azaheterociclilo multicíclico sustituido" significa un grupo azaheterociclilo multicíclico como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento. "Azaheterociclenilo multicíclico sustituido" significa un grupo azaheterociclenilo multicíclico como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento.

"Heterociclileno" significa un grupo heterociclilo bivalente tal como se define en el presente documento que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los tamaños de anillo preferentes del heterociclileno incluyen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo; y también se hace referencia a tales tamaños de anillo preferentes como "inferior". Los puntos de unión en el grupo cicloalquilenilo incluyen patrones de unión 1,1-, 1,2-, 1,3-, o 1,4- y, donde sea aplicable, la relación estereoquímica de los puntos de unión es o bien cis o bien trans. Los grupos heterociclileno ejemplares incluyen (1,1-, 1,2- o 1,3-)piperidinileno y (1,1- o 1,2-) tetrahidrofuranoileno. "Heterociclileno sustituido" significa un grupo heterociclileno como se ha definido en lo que antecede que está sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo de anillo" (preferentemente de 1 a 3) que pueden ser iguales o diferentes y son tal como se define en el presente documento.

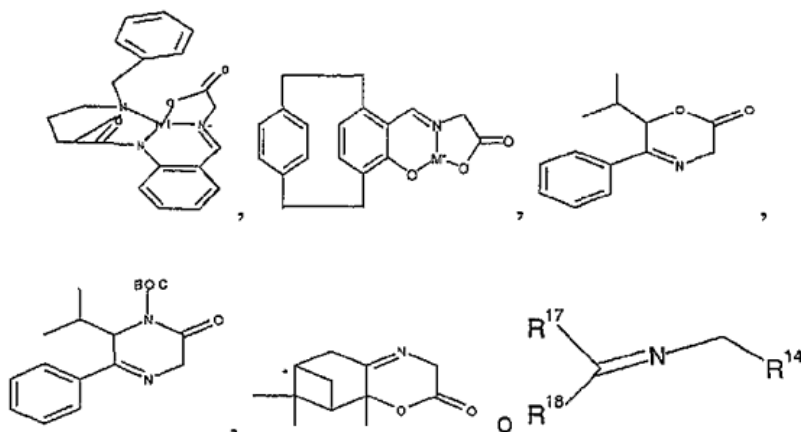
"Hidrato" significa un solvato en el que la molécula o moléculas de disolvente es/son H_2O .

"Grupo protector de amina lábil frente a hidrogenación" significa un grupo protector de amina tal como se define en el presente documento que se retira con facilidad mediante hidrogenación mientras que permanece relativamente estable frente a otros reactivos. Un grupo protector de amina lábil frente a hidrogenación preferente es Cbz.

"Grupo protector de ácido lábil frente a hidrogenación" significa un grupo protector de ácido tal como se define en el presente documento que se retira con facilidad mediante hidrogenación mientras que permanece relativamente estable frente a otros reactivos. Un grupo protector de ácido lábil frente a hidrogenación preferido es bencilo.

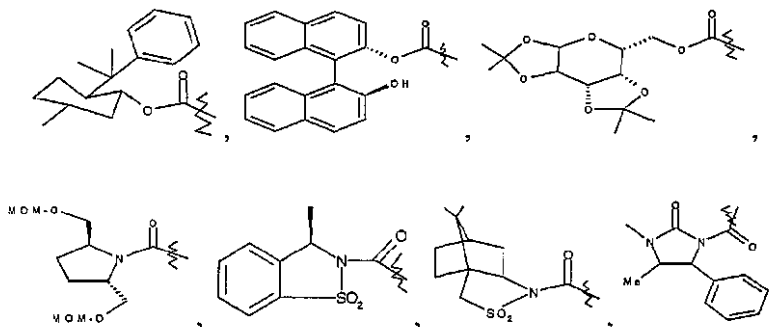
"Higroscopicidad" significa sorción, implicando una cantidad o estado adquirido de agua suficiente para afectar a las propiedades físicas o químicas de la sustancia (Eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 10, 33).

"Derivado de glicinimida imínica" significa una base de Schiff imínica de una glicina que es útil en la síntesis de α -aminoácidos, tanto naturales como no naturales. La funcionalidad de éster imínico puede contener uno o más centros asimétricos que pueden ayudar en la estereoinducción durante el procedimiento de formación de enlaces. Además, estos derivados de glicinimida imínica pueden incorporarse a soportes poliméricos para facilitar la síntesis de combinación. Los derivados de glicinimida imínica pueden prepararse mediante la condensación de un éster de glicina con la cetona apropiada en presencia de un catalizador ácido. La reacción se facilita por la retirada de agua. Los derivados de glicinimida imínica son bien conocidos en la técnica para su uso en procedimientos sintéticos de adición de Michael, por ejemplo tal como se divulga por Guillena, G., y col., *J. Org. Chem.* 2000, 65, 7310-7322. Los ejemplos particulares de derivados de glicinimida imínica de acuerdo con la invención incluyen uno seleccionado entre el grupo de fórmulas



en las que:

M* es un metal de transición, preferentemente CU, más preferentemente CU^{II}.
 R¹⁴ es -CO₂R¹⁶, -CN,

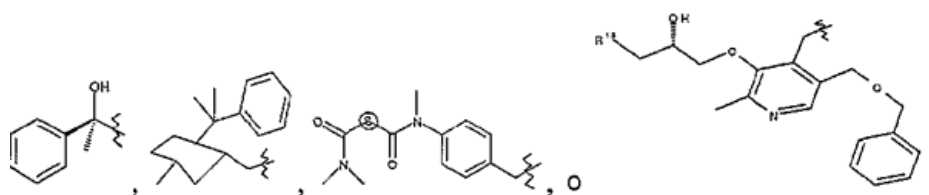


5

o -CONR¹⁵R¹⁵,

R¹⁵ es un grupo alifático opcionalmente sustituido;

R¹⁶ es un grupo protector de ácido, arilo opcionalmente sustituido, o grupo alifático opcionalmente sustituido; R¹⁷ es arilo opcionalmente sustituido, grupo alifático opcionalmente sustituido,



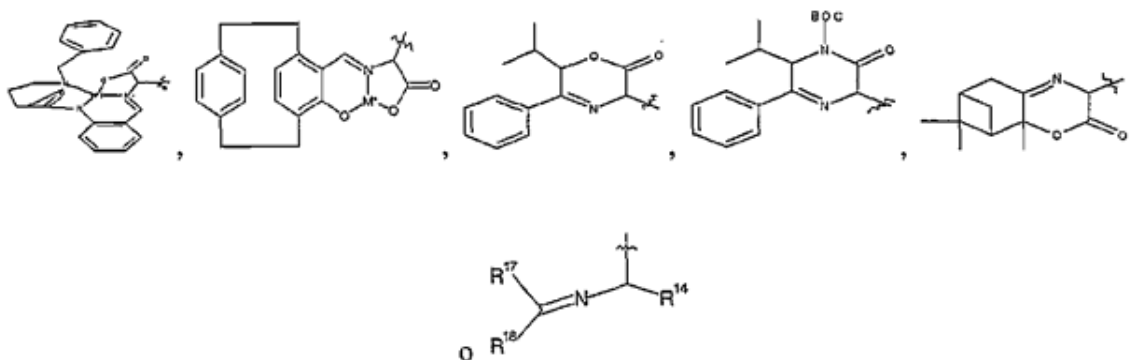
10

R¹⁸ es hidrógeno, alquilo, o alquilitio; o arilo opcionalmente sustituido;
 R¹⁷ y R¹⁸ tomados junto con el carbono al que R¹⁷ y R¹⁸ están unidos



y ⊕ es una fase sólida.

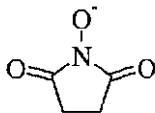
15 "Producto de adición de derivado de glicinimida imínica" significa el compuesto resultante en el que un α-hidrógeno con respecto al nitrógeno y el resto carbonilo de la porción de base de Schiff se retira y se usa para formar una unión para la formación de enlaces con el mismo. Los ejemplos particulares de productos de adición de derivado de glicinimida imínica de acuerdo con la invención incluyen uno seleccionado entre el grupo de fórmulas



en las que:

R^{14} , R^{17} , y R^{18} se definen tal como se describe en la definición de derivado de glicinimida imínica en el presente documento.

5 "N-oxisuccinimida" significa un resto de la siguiente estructura



"N-óxido" significa un resto de la siguiente estructura



"Paciente" incluye tanto seres humanos como otros mamíferos.

10 "Peptidomimético" significa un polímero que incluye restos aminoácídicos unidos juntos a través de enlaces amida.

"Éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que hidrolizan *in vivo* e incluyen aquellos que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano para dejar el compuesto precursor o una sal del mismo. Los grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, particularmente ácidos alcanoicos, alquenoicos, cicloalcanoicos y alcanodioicos, en que cada resto alquilo o alquenoilo tiene de forma ventajosa no más de 6 átomos de carbono. Ésteres ejemplares incluyen formiatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos, etilsucinatos, y similares.

"Profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usa en el presente documento se refiere a aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, con mensurados con una proporción razonable de beneficio/riesgo, y eficaces para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención. El término "profármaco" se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* produciendo el compuesto precursor de la fórmula anterior, por ejemplo por hidrólisis en la sangre. Los grupos funcionales que pueden transformarse rápidamente, por escisión metabólica, *in vivo* forman una clase de grupos reactivos con el grupo carboxilo de los compuestos de la presente invención. Incluyen, aunque sin limitación, grupos tales como alcanoilo (tales como acetilo, propanoilo, butanoilo, y similares), aroilo no sustituido y sustituido (tal como benzoilo y benzoilo sustituido), alcocarbonilo (tal como etoxicarbonilo), trialkilsililo (tal como trimetil- y trietilsililo), monoésteres formados con ácidos dicarboxílicos (tal como succinilo), y similares. A causa de la facilidad con que los grupos metabólicamente escindibles de los compuestos de la presente invención se escinden *in vivo*, los compuestos que albergan dichos grupos actúan como profármacos. Los compuestos que albergan los grupos metabólicamente escindibles tienen la ventaja de que muestran biodisponibilidad mejorada como resultado de una potenciada solubilidad y/o tasa de absorción conferida al compuesto precursor en virtud de la presencia del grupo metabólicamente escindible. Se proporciona un análisis minucioso en Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Enzymology; K. Widder y col, Ed., Academic Press, 42, 309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Development, Krosggaard- Larsen and H. Bandaged, ed., Capítulo 5; "Design and Applications of Prodrugs" 113-191 (1991); Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci., 77, 285 (1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya y col, 32, 692 (1984); Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi y V. Stella, 14 A.C.S. Symposium Series, y Bioreversible Carriers in Drug Design, E.B. Roche, ed., American

Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales de adición de ácido, y sales de adición de base, orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos. En particular, las sales de adición de ácido pueden prepararse haciendo que reaccione por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal que se forma de este modo. Las sales de adición de ácido ejemplares incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, sulfamatos, malonatos, salicilatos, propionatos, metileno-bis-β-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinateslaurilsulfonatos y similares. Véase por ejemplo S. M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977). Las sales de adición de base también pueden prepararse haciendo que reaccione por separado el compuesto purificado en su forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada y aislando la sal que se forma de este modo. Las sales de adición de base incluyen sales de metal y de amina farmacéuticamente aceptables. Las sales de metal adecuadas incluyen las sales de sodio, potasio, calcio, bario, cinc, magnesio, y aluminio. Las sales de sodio y potasio son preferentes. Las sales de adición de base inorgánicas adecuadas se preparan a partir de metal bases que incluyen hidruro de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de cinc y similares. Las sales de adición de base de amina adecuadas se preparan a partir de aminas que tienen suficiente basicidad para formar una sal estable, y preferentemente incluyen aquellas aminas que se usan con frecuencia en la química médica debido a su baja toxicidad y aceptabilidad para uso médico, amoniaco, etilendiamina, N-metil-glucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio, trietilamina, dibencilamina, efenamina, dehidroabietilamina, N-etilpiperidina, bencilamina, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, aminoácidos básicos, por ejemplo, lisina y arginina, y dicitlohexilamina y similares.

"Sustituyentes de grupo de anillo" significan sustituyentes unidos a sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos incluyendo arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, cicliilcarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, cicliilcarboniloxi, aroiloxi, heteroaróiloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, alcocicarbonilo, cicliloxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, cicliiltio, ariltio, heteroariltio, cicliilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, en los que Y¹, Y² e Y³ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o para cuando el sustituyente es Y¹Y²N-, entonces uno de Y¹ e Y² puede ser acilo, cicliilcarbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcocicarbonilo, cicliloxicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y¹ e Y² es tal como se ha definido previamente, o para cuando el sustituyente es Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, Y¹ e Y² también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y¹ e Y² están unidos para formar un azaheterocicliilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros. Cuando un sistema de anillo está saturado o parcialmente saturado, los "sustituyentes de grupo de anillo" incluyen además, metileno (H₂C=), oxo (O=) y tioxo (S=). Sustituyentes de grupo de anillo ácido/de amida son carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo e Y¹Y²NCO-. Sustituyentes de grupo de anillo polar no ácido son hidroxilo, oxo (O=), tioxo (S=), acilo o su análogo tioxo, cicliilcarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, alcocicarbonilo, cicliloxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, aciloxi, cicliilcarboniloxi, aroiloxi, heteroaróiloxi, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-.

"Solvato" significa una asociación física de un compuesto de la presente invención con una o más moléculas disolventes. Esta asociación física incluye la formación de enlaces de hidrógeno. En ciertos casos el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" engloba solvatos tanto en fase de solución y aislables. Los solvatos ejemplares incluyen hidratos, etanolatos, metanolatos y similares.

Realizaciones

Con referencia a las invenciones que se describen en el presente documento, en lo sucesivo se dan realizaciones preferentes y particulares relacionadas con las mismas.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁰ es un enlace.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁰ es difluorometileno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^1 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^1 es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^1 es hidrógeno.

- 5 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^2 es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o grupo monocíclico opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^2 es alquilo inferior opcionalmente sustituido, alquenilo inferior opcionalmente sustituido, o cicloalquilo monocíclico opcionalmente sustituido.

- 10 Una realización más particular de acuerdo con la invención es en la que R^2 es carboximetilo, 1-carboxi-2-feniletilo, ciclopropilo, ciclobutilo, 1-ciclohexiletilo, 1-feniletilo, but-2-ilo, 1-pirid-4-iletilo, propen-3-ilo o 3-metilbut-2-ilo; más preferentemente ciclopropilo.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^3 es metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

- 15 Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^3 es metileno (de alquilo o alquenilo) inferior opcionalmente halosustituido.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^3 es propilmetileno, 2,2-difluoroetilmetileno, 2,2,2-trifluorometileno o propen-3-ilmetileno; R^3 más preferente es propilmetileno o 2,2-difluoroetilmetileno; R^3 adicionalmente preferente es propilmetileno.

- 20 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^4 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^4 es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^4 es hidrógeno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^5 es metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

- 25 Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^5 es metileno (de alquilo o alquenilo inferior) opcionalmente (fenil-, carboxi-, carboxamido- o alcoxycarbonil) sustituido.

- 30 Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^5 es metilmetileno, isopropilmetileno, f-butilmetileno, but-2-ilmetileno, butilmetileno, bencilmetileno, 3-metilbutilmetileno, 2-metilpropilmetileno, carboximetilmetileno, carboxamidometilmetileno, benciloxycarbonilmetilmetileno, benciloxycarbonilpropilmetileno, o fenilpropen-3-ilmetileno; R^5 más preferente es isopropilmetileno o f-butilmetileno.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^6 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^6 es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^6 es hidrógeno.

- 35 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^7 es metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido, metileno de grupo cíclico inferior opcionalmente sustituido o (aril o heteroaril) metileno monocíclico opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^7 es alquilmetileno inferior opcionalmente sustituido, cicloalquilmetileno inferior opcionalmente sustituido o fenilmetileno opcionalmente sustituido.

- 40 Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^7 es metilmetileno, isopropilmetileno, n-propilmetileno, fenilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, t-butilmetileno, s-butilmetileno, ciclohexilmetilmetileno, o fenilmetilmetileno; más preferente es isopropilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, t-butilmetileno o s-butilmetileno.

- 45 Una realización preferente de acuerdo con la invención también es en la que cada uno de R^3 , R^5 , y R^7 es metileno monosustituido.

Una realización preferente de acuerdo con la invención también es en la que R^3 es metileno monosustituido y tiene una configuración (S) en el carbono unido al resto $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁸ es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁸ es hidrógeno o alquilo inferior.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R⁸ es hidrógeno.

5 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o grupo aromático monocíclico opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es alquilo inferior opcionalmente sustituido o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.

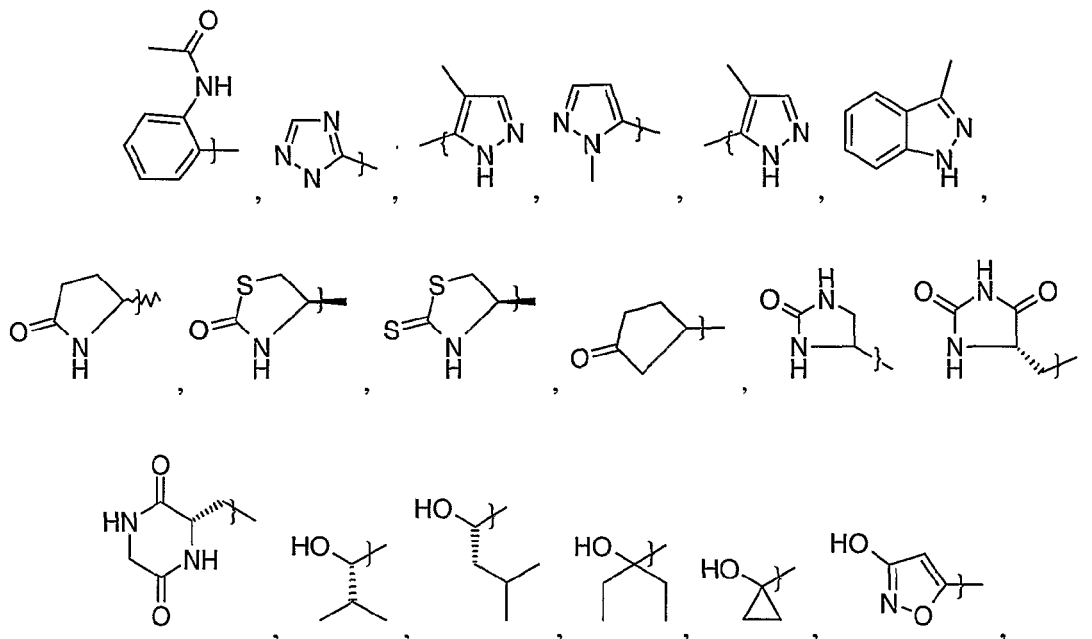
10 Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es alquilo inferior opcionalmente (carboxi-, (alquilo inferior)SO₂NH-, (alquilo inferior)HNCO-, hidroxil-, fenil-, heteroaril-, o (alquilo inferior)OC(O)NH-) sustituido, o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.

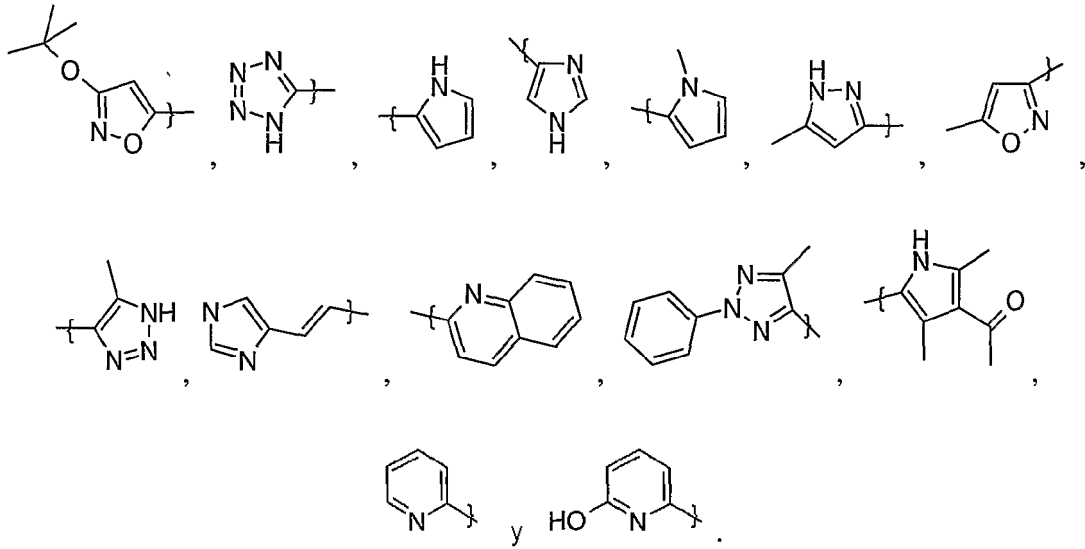
Una realización más preferente de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es alquilo inferior sustituido con (mono- di-)MeOC(O)NH-; más preferente es 1,2-di(MeOC(O)NH)etilo o 1-(MeOC(O)NH)etilo.

15 Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es alquilo inferior (carboxi-, (alquilo inferior)HNCO- o tetrazolil) sustituido; más preferentemente 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo, 3-(N-metilcarboxamido)propilo o 3-carboxi-2,2-dimetilpropilo; adicionalmente preferente es 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo o 3-(N-metilcarboxamido)propilo.

20 Otra realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es alquilo inferior opcionalmente sustituido; más preferente es 1-hidroxil-2-feniletilo, metilo, isopropilo o f-butilo; adicionalmente preferente es metilo, isopropilo o f-butilo.

Otra realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R⁹ se selecciona entre el grupo que consiste en





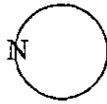
Otra realización preferente más de acuerdo con la invención es en la que R⁹ es pirazinilo.

5 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R¹⁰ es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R¹⁰ es hidrógeno o alquilo inferior.

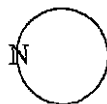
Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R¹⁰ es hidrógeno.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que

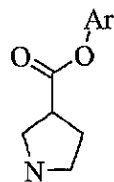


10 como un azaheterocicilo monocíclico sustituido es pirrolidinilo sustituido.

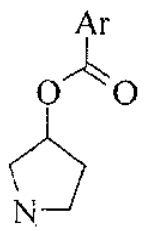
Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que



como un azaheterocicilo monocíclico sustituido es

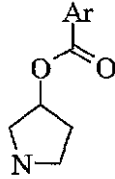


15 opcionalmente sustituido o



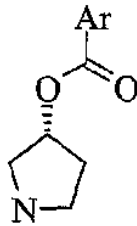
opcionalmente sustituido

en la que Ar es R² que comprende un resto aromático; más preferente es

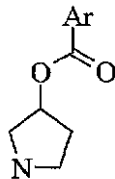


opcionalmente sustituido

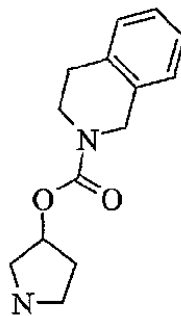
5 adicionalmente preferente es



opcionalmente sustituido.

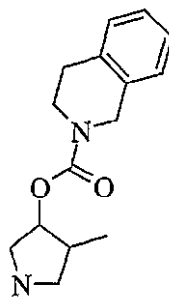


opcionalmente sustituido adicionalmente preferente es



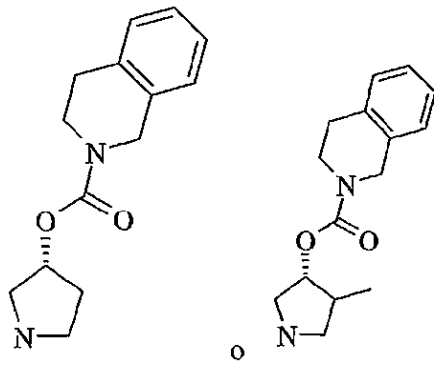
10

o

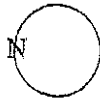


;

más adicionalmente preferente



Se describen compuestos en los que



5

como un azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido es



opcionalmente sustituido;

10 más preferente es



opcionalmente sustituido.

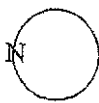
Sustituyentes particulares para



15

son hidroxilo, fluoro u oxo.

Se describen otros compuestos en los que



como un azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido es

5

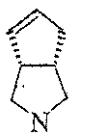


opcionalmente sustituido;
más preferente es



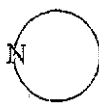
10

adicionalmente preferente es

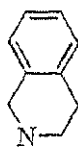


Los compuestos que se describen incluyen además aquellos en los que

15



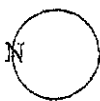
como un azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido es



opcionalmente sustituido.

20

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)NR^2R^1$ unido a



está unido a un carbono α con respecto al átomo de nitrógeno.

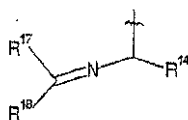
5 Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que L es $-C(O)-$ o $-OC(O)-$.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que n es 0,

Otra realización preferente de acuerdo con la invención es en la que n es 1.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{11} es $-CO_2R^{13}$,

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{12} es



10

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{13} es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{13} es un grupo alquilo. Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{13} es alquilo inferior. Otra realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{13} es metilo. Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{14} es $-CO_2R^{16}$.

15

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{15} es alquilo.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{15} es alquilo inferior. Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{15} es metilo.

20 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{16} es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

Otra realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{16} es alquilo. Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{16} es alquilo inferior. Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{16} es t-Bu.

25 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{17} es arilo opcionalmente sustituido.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{17} es fenilo.

Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que R^{18} es arilo opcionalmente sustituido.

Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que R^{18} es fenilo.

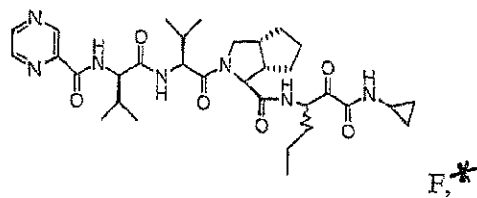
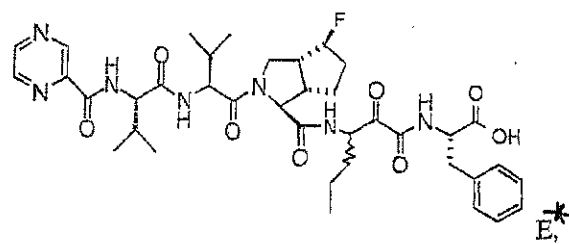
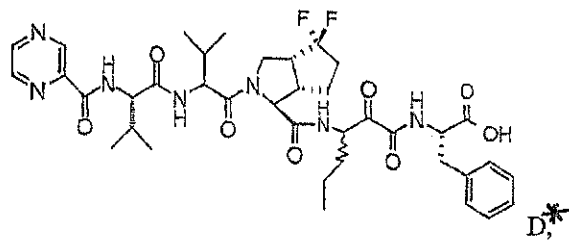
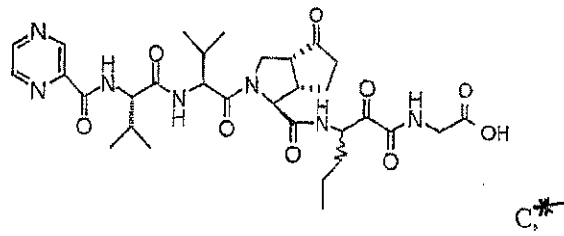
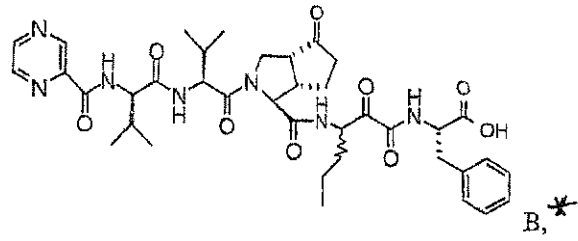
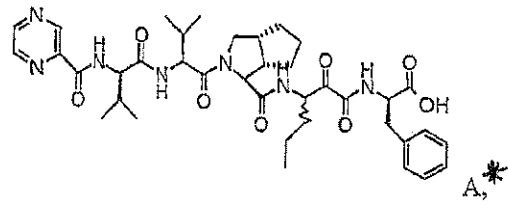
30 Una realización particular de acuerdo con la invención es en la que p^0 se selecciona entre el grupo que consiste en BOC, CBz, y $-CO_2$ -alquilo.

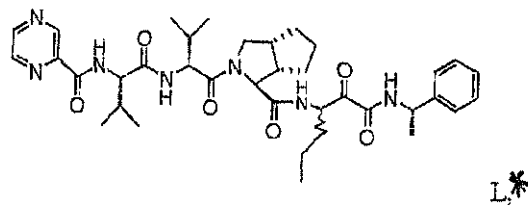
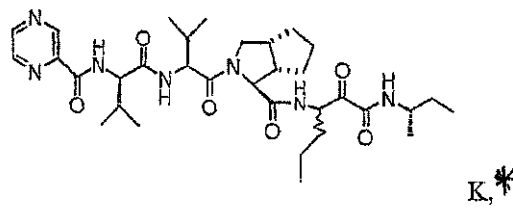
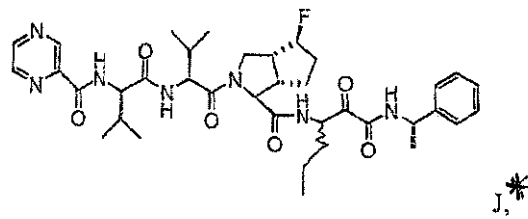
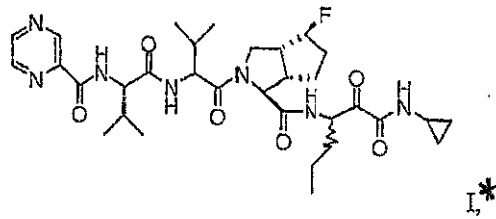
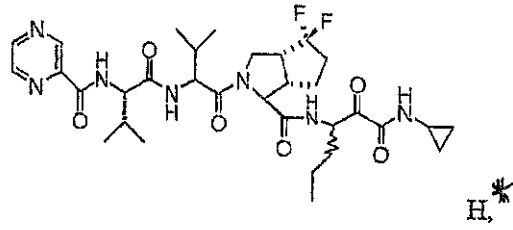
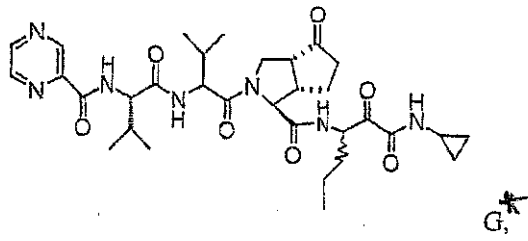
Una realización preferente de acuerdo con la invención es en la que p^0 es BOC.

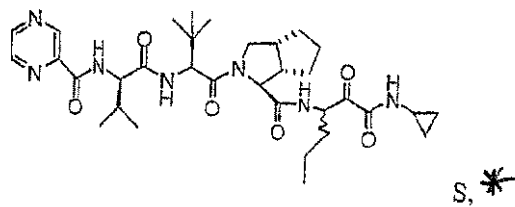
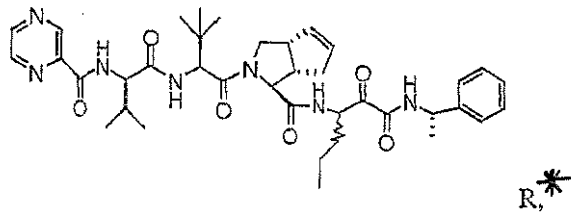
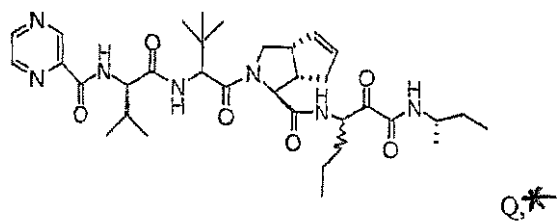
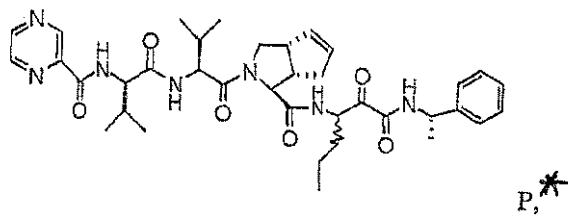
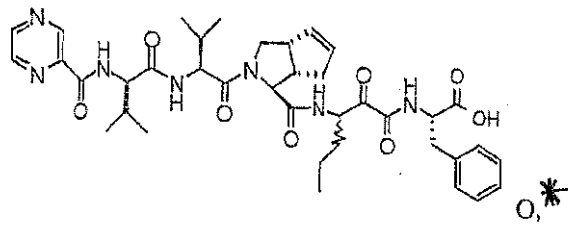
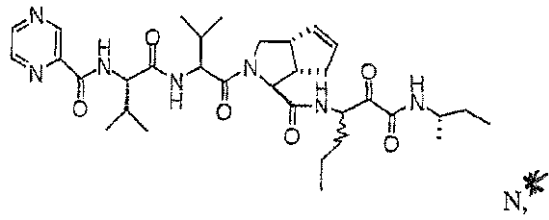
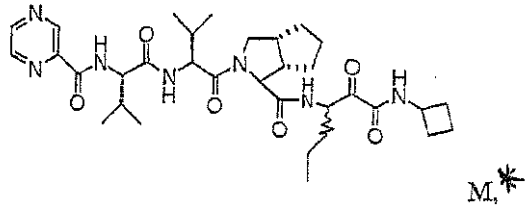
Debe apreciarse que la presente invención cubre todas las combinaciones apropiadas de las agrupaciones particulares y preferentes a las que se hace referencia en el presente documento.

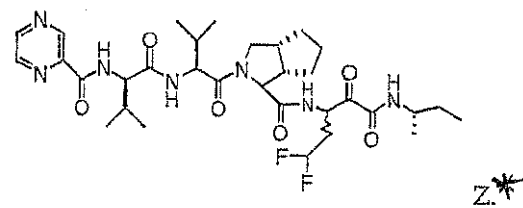
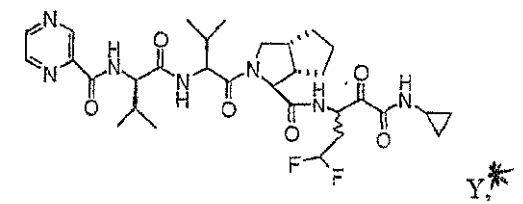
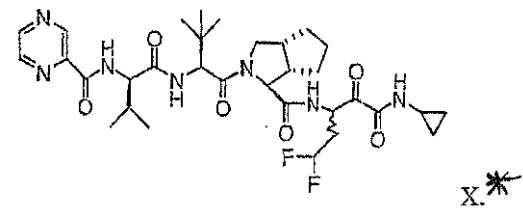
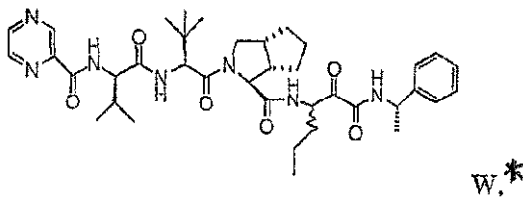
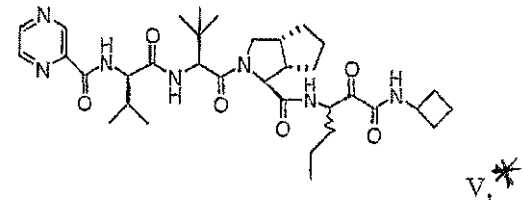
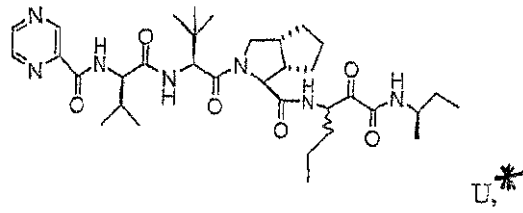
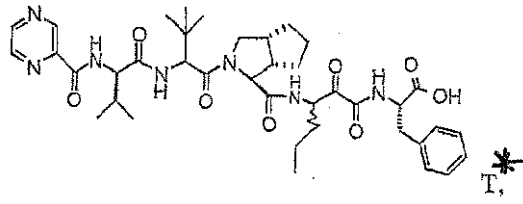
Los compuestos particulares de acuerdo con la invención y compuestos de comparación (marcados por un asterisco) se seleccionan entre el grupo de compuestos A-FH que consiste consecutivamente en

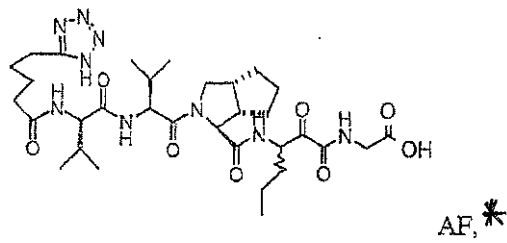
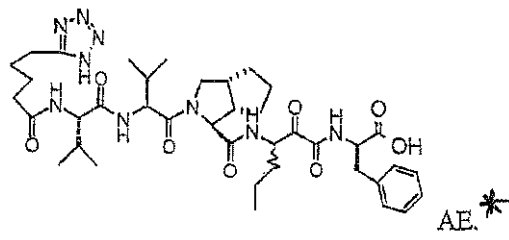
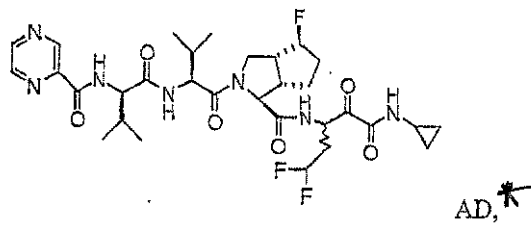
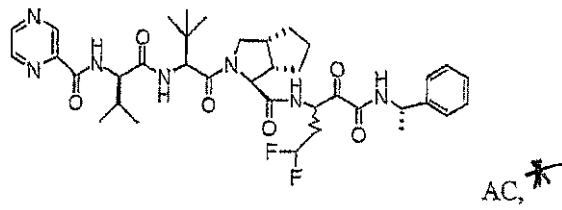
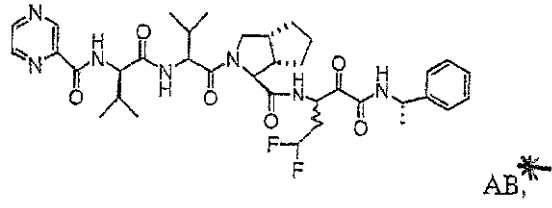
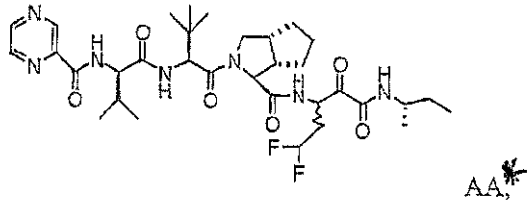
35

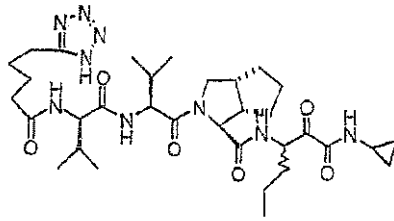




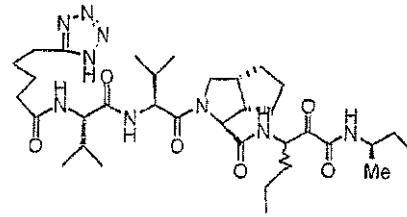




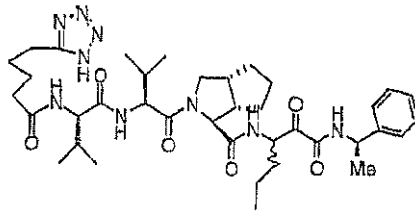




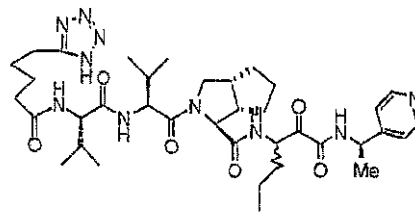
AG,*



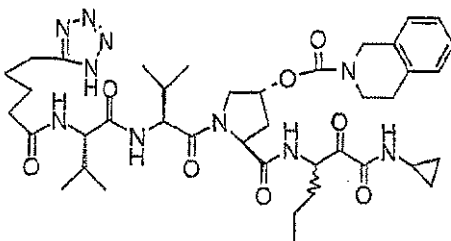
AH,*



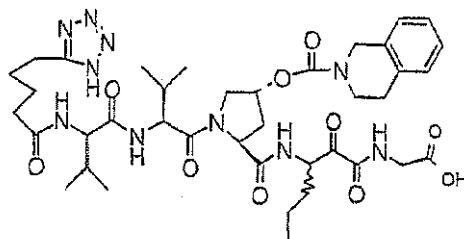
AI,*



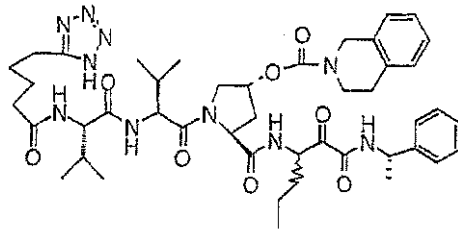
AJ,*



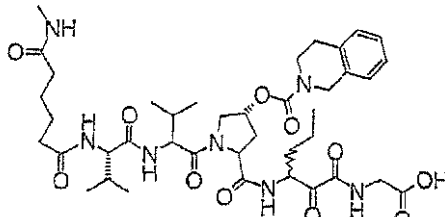
AK,



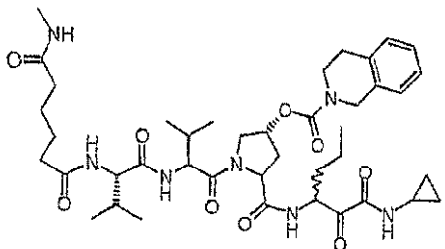
AL,



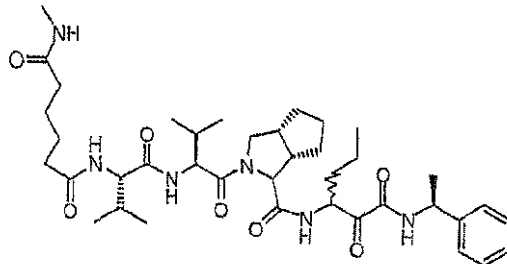
AM,



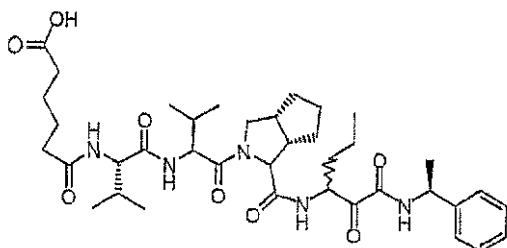
AN,



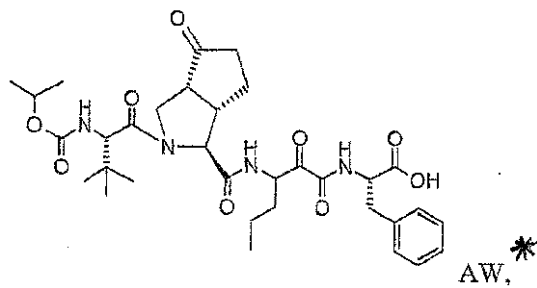
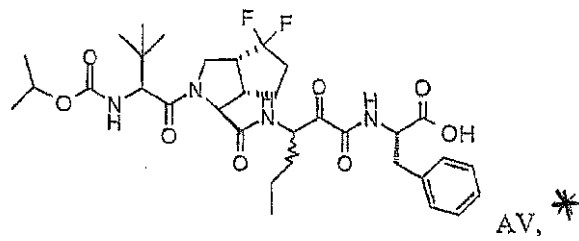
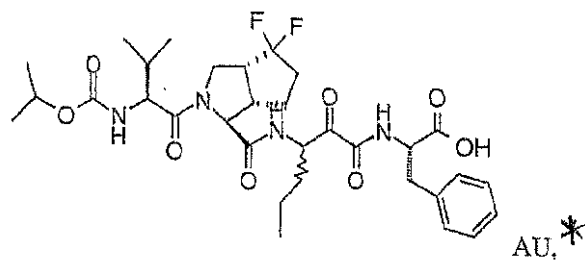
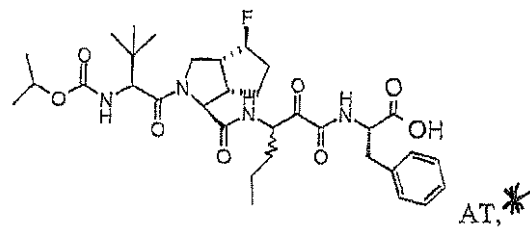
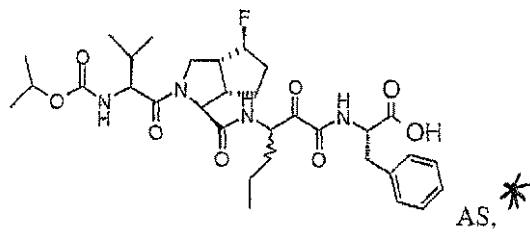
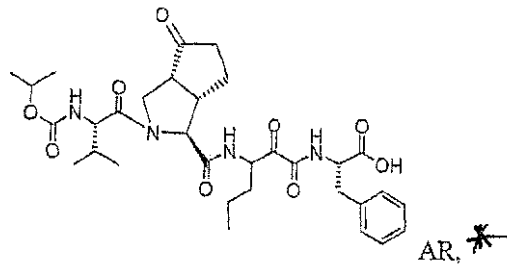
AO,

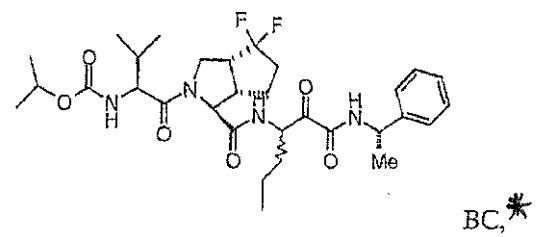
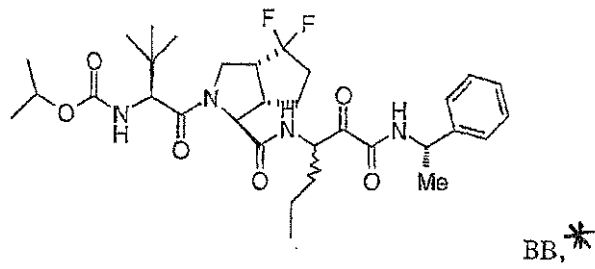
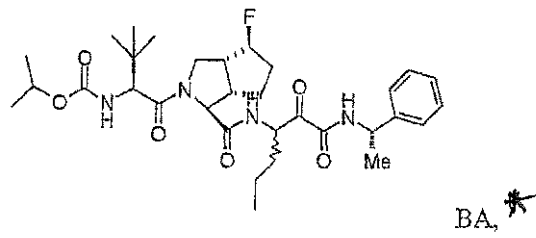
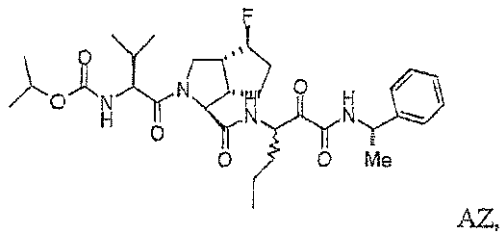
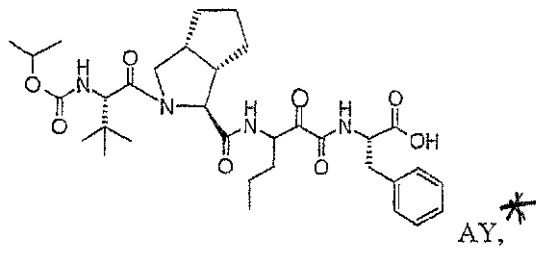
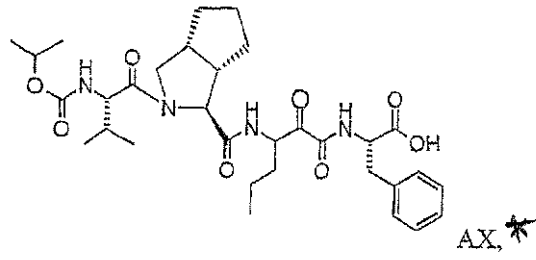


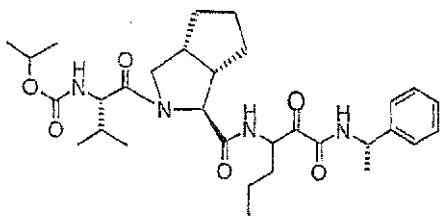
AP,*



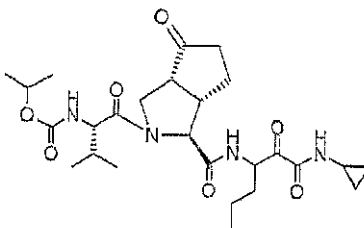
AQ,*



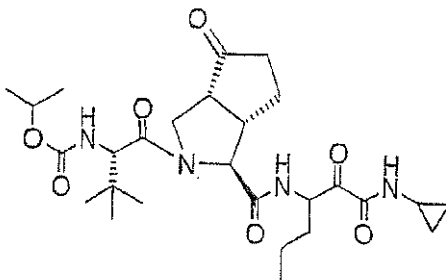




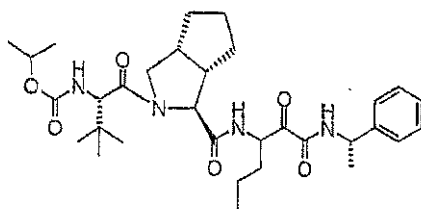
BD,*



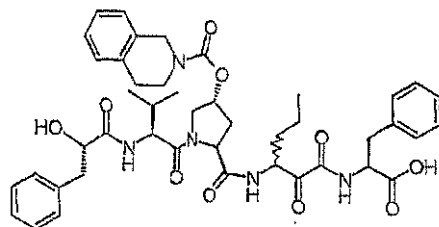
BE,*



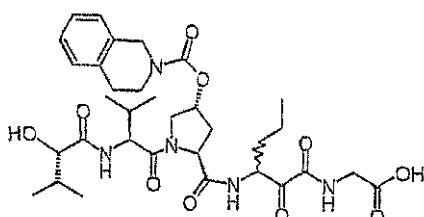
BF,*



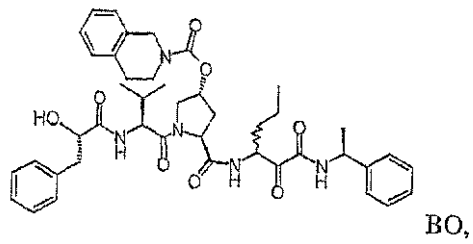
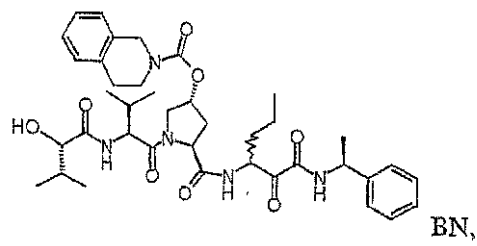
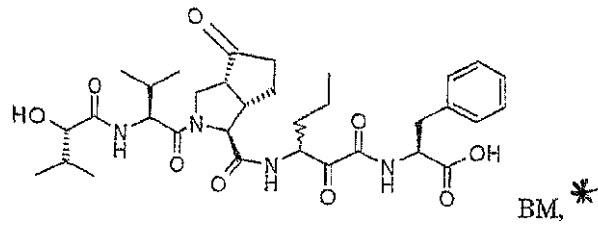
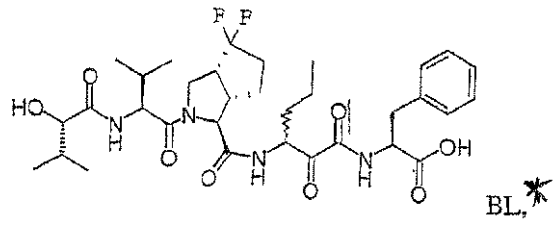
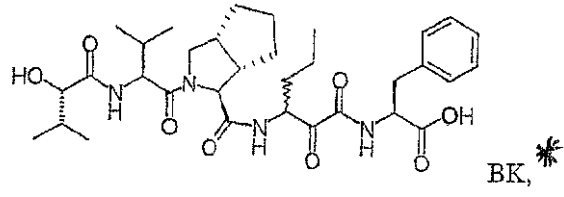
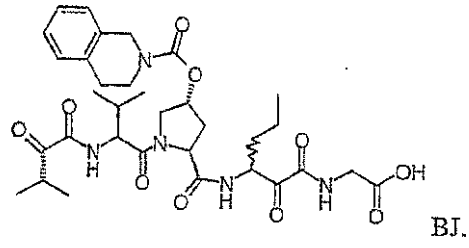
BG,*

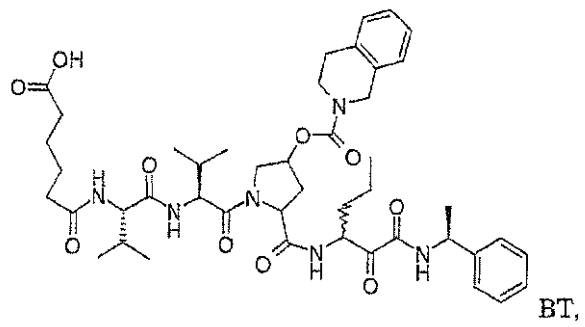
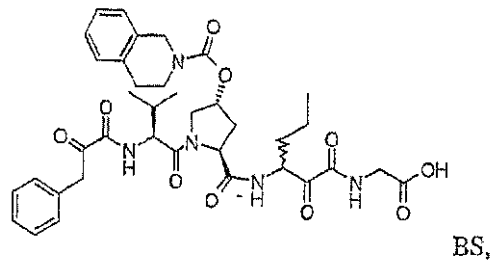
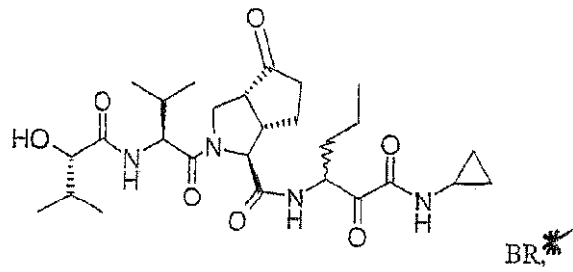
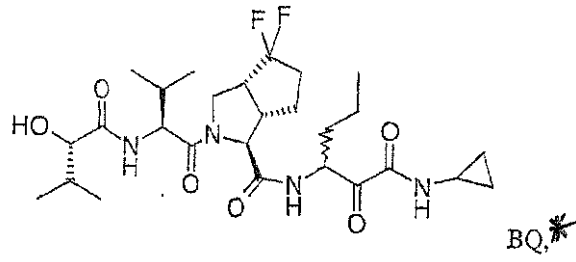
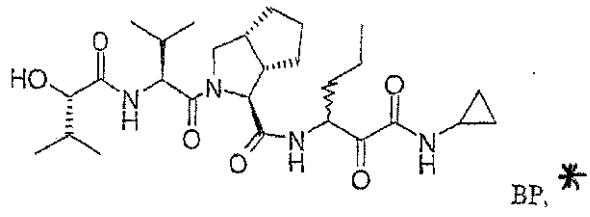


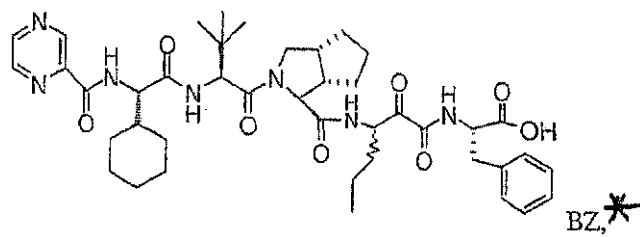
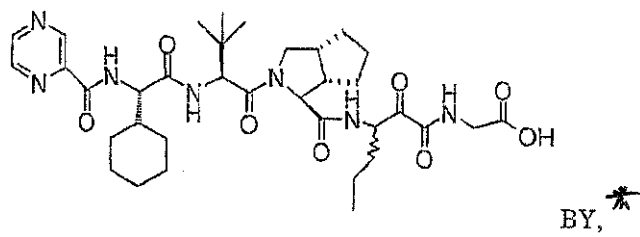
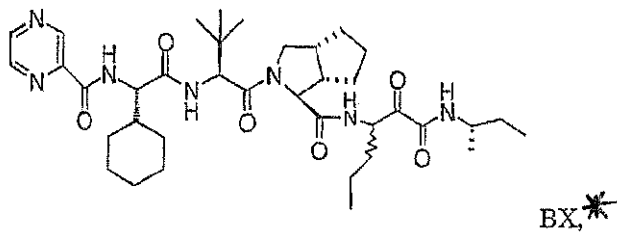
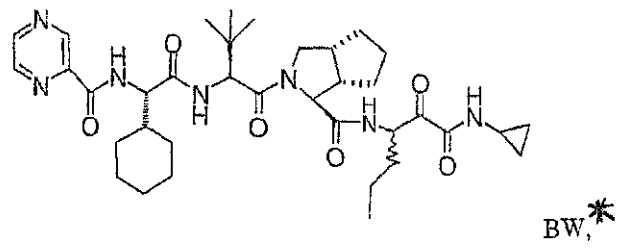
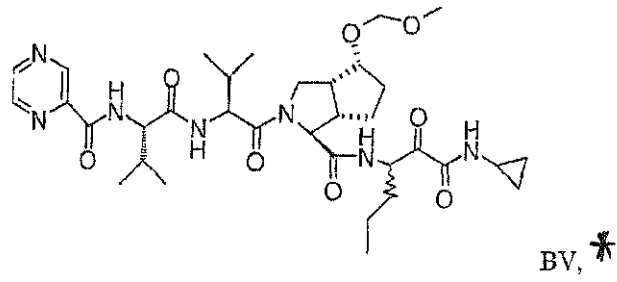
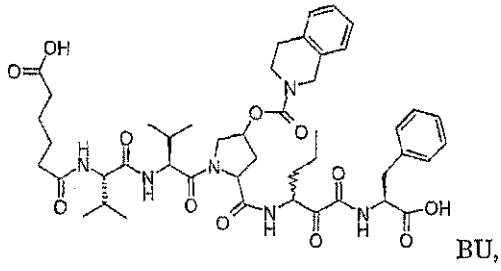
BH,

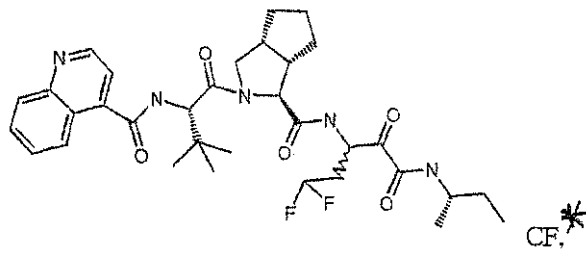
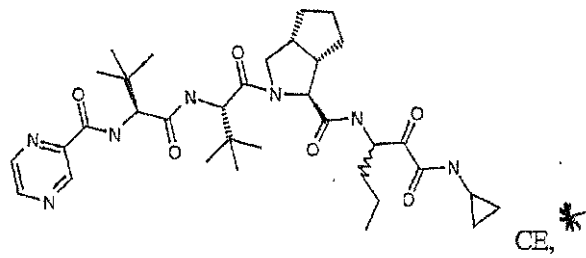
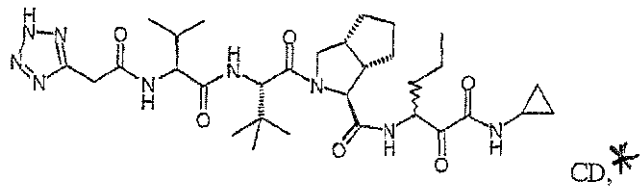
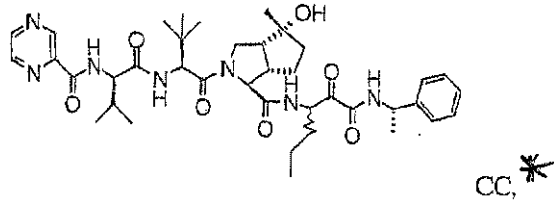
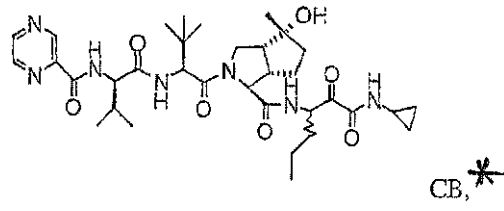
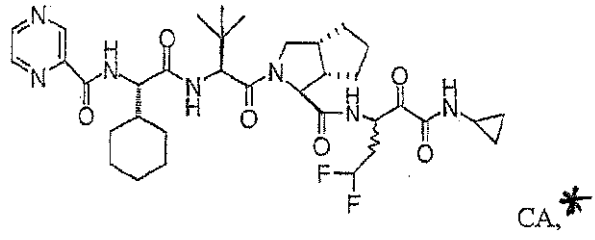


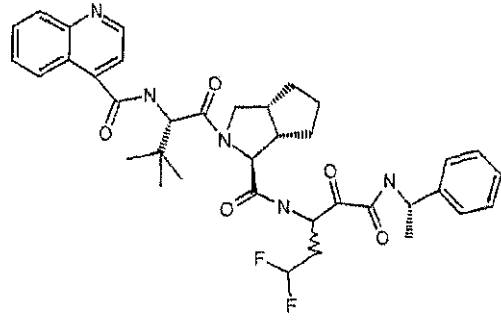
BI,



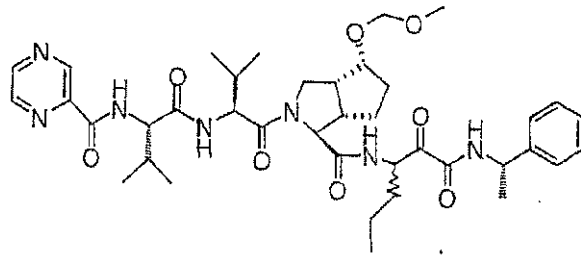




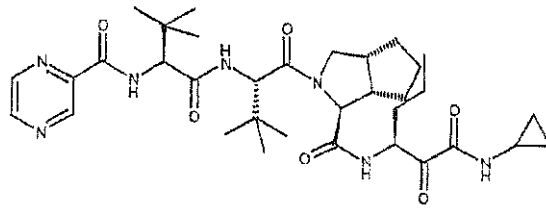




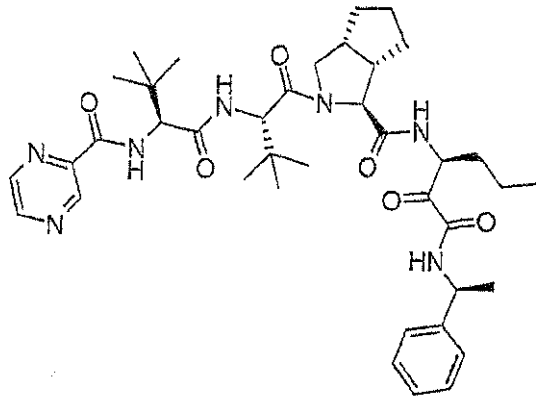
CG, *



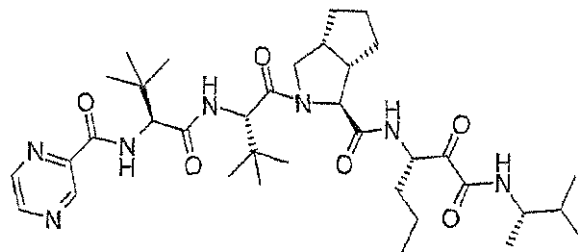
CH, *



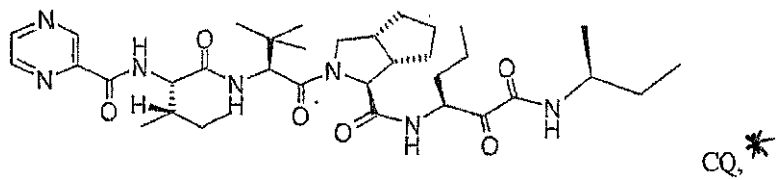
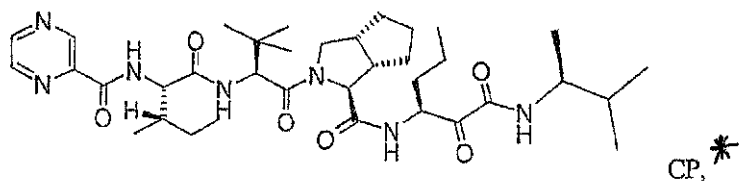
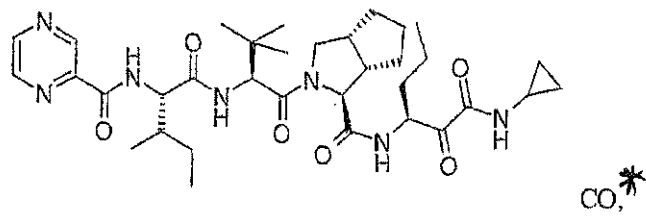
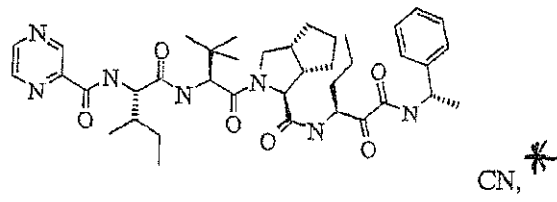
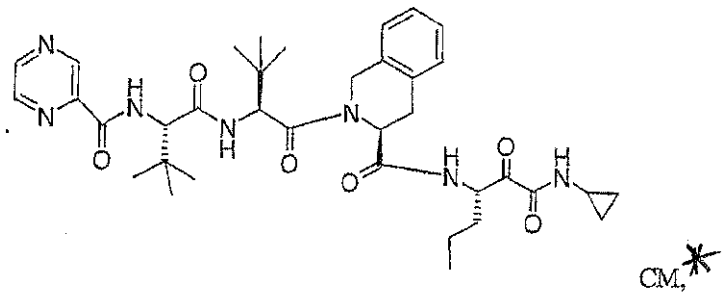
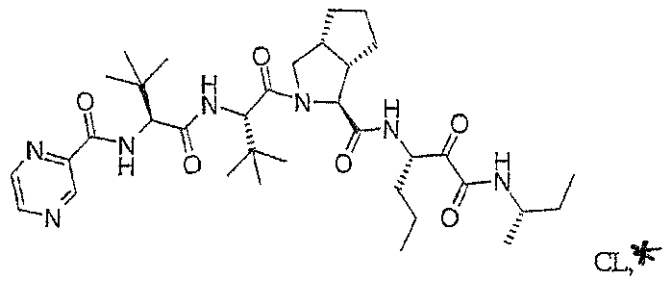
CI, *

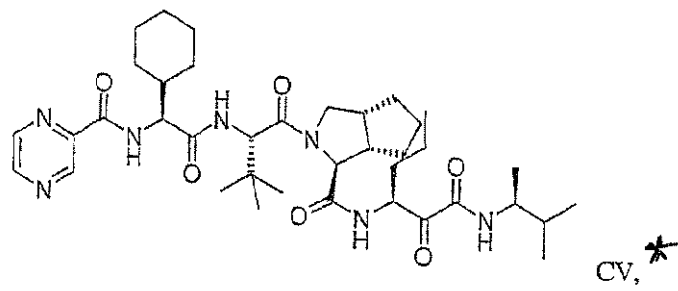
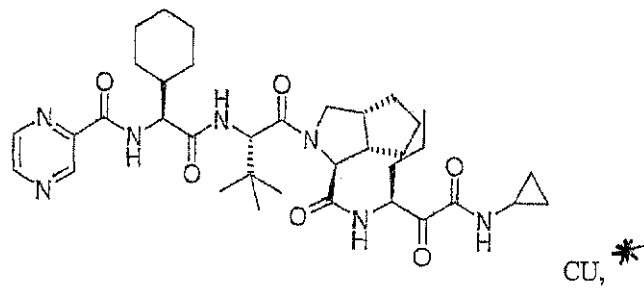
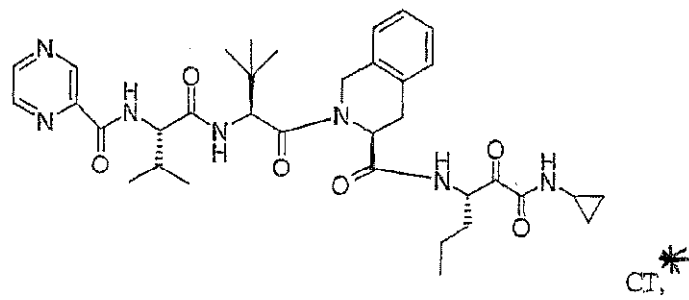
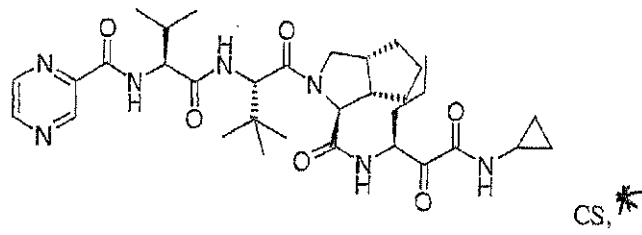
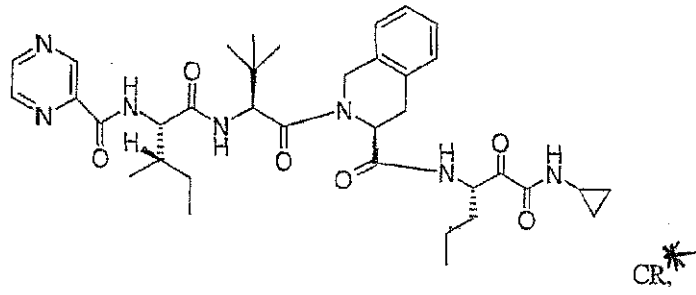


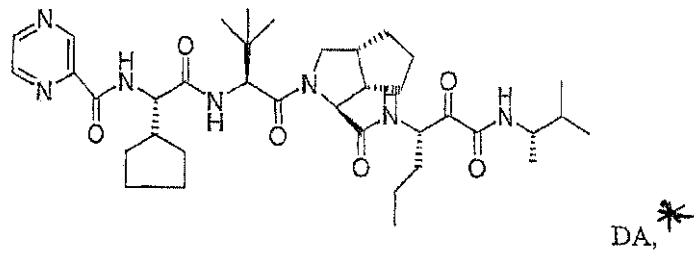
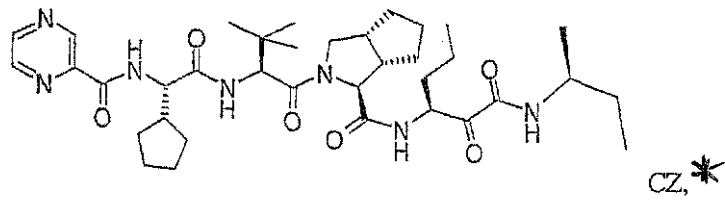
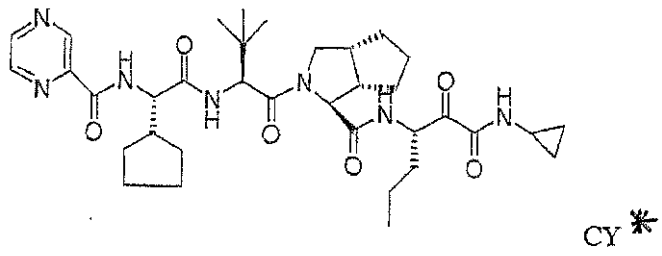
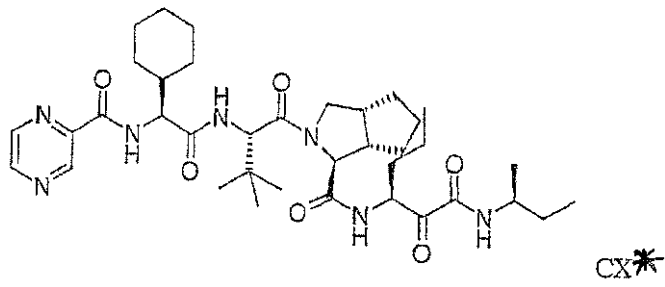
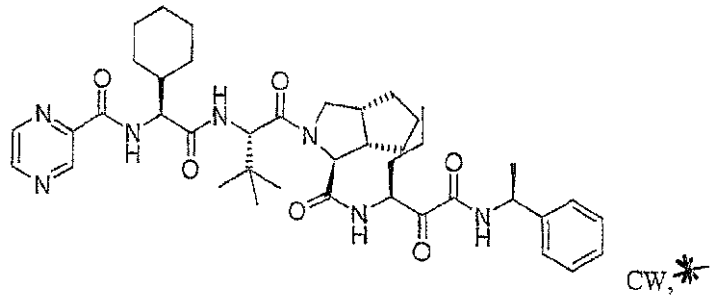
CJ, *

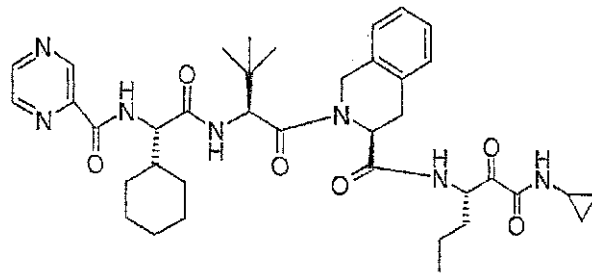


CK, *

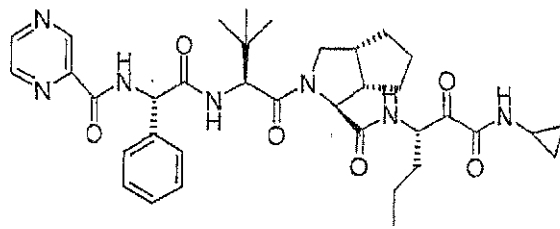




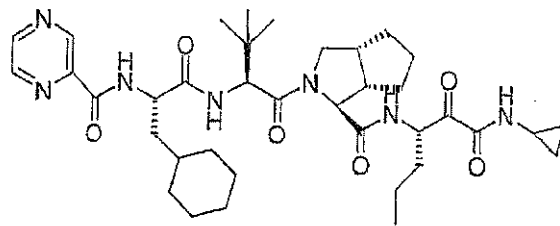




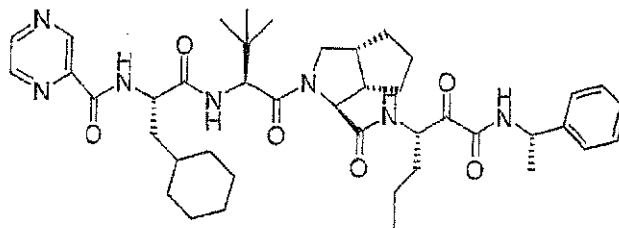
DB, *



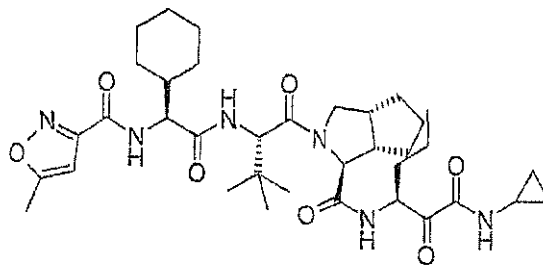
DC, *



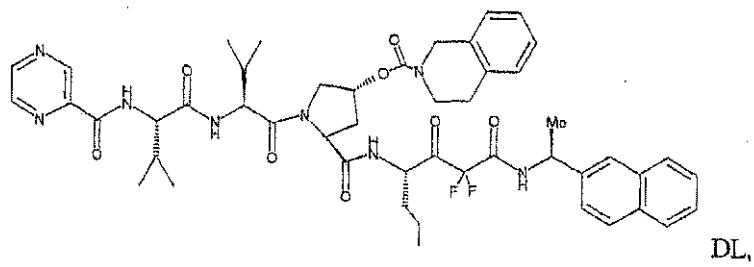
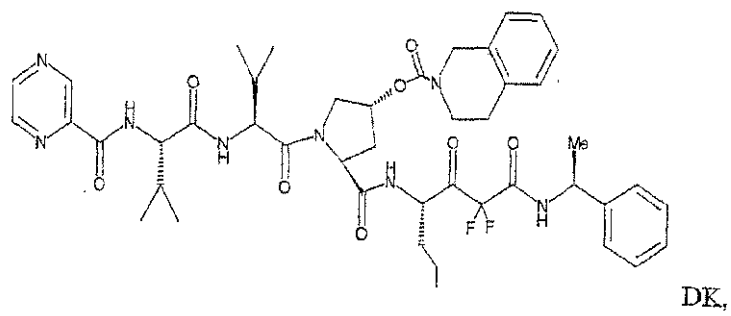
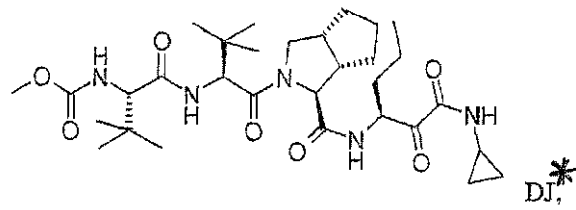
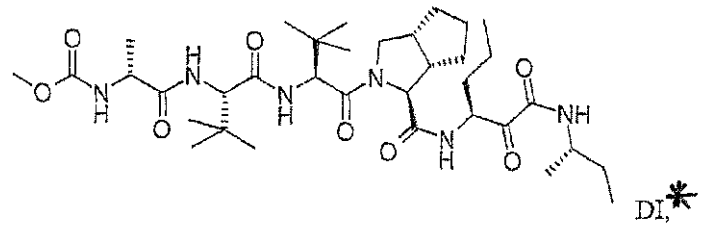
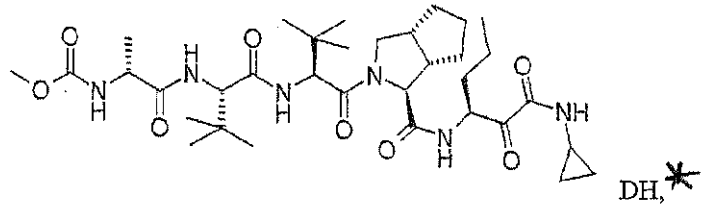
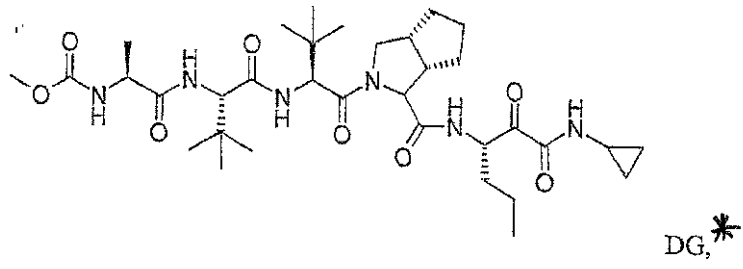
DD, *

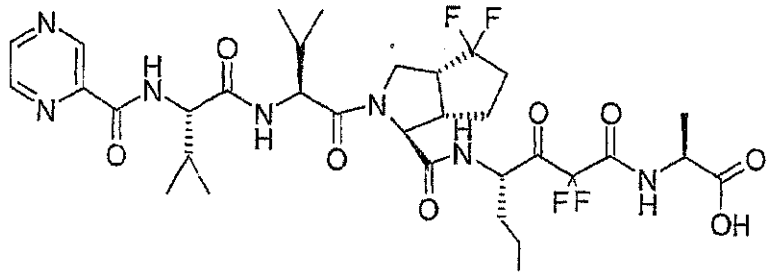


DE, *

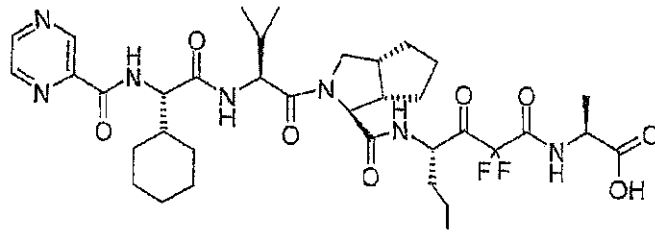


DF, *

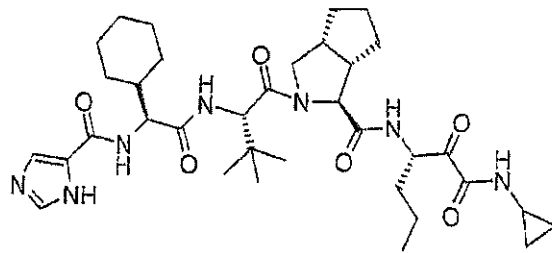




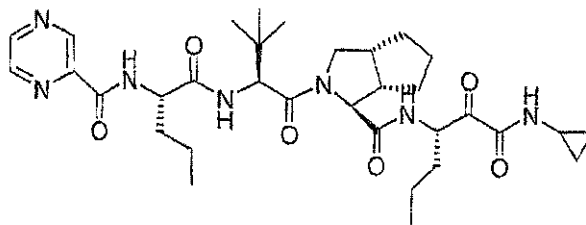
DR, *



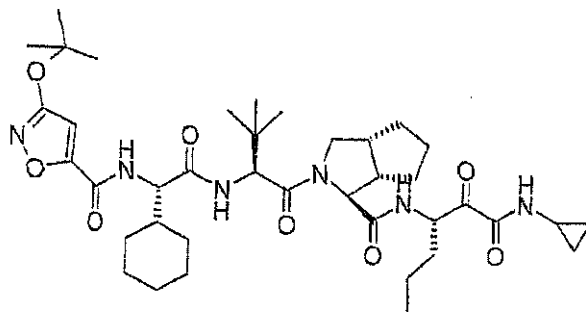
DS, *



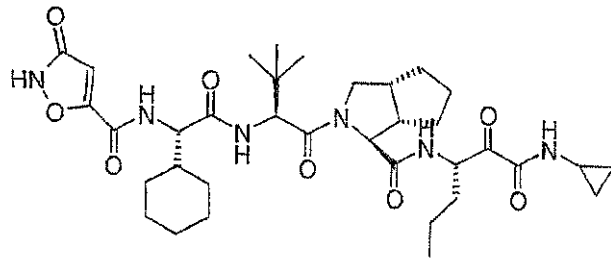
DT, *



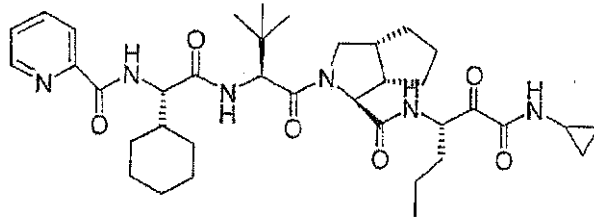
DU, *



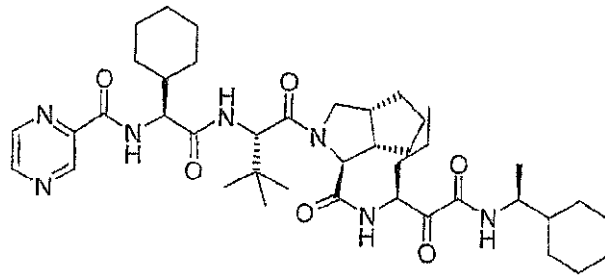
DV, *



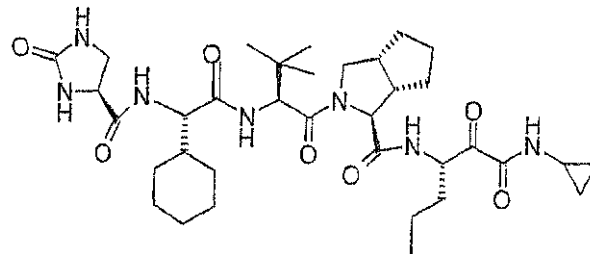
DW, *



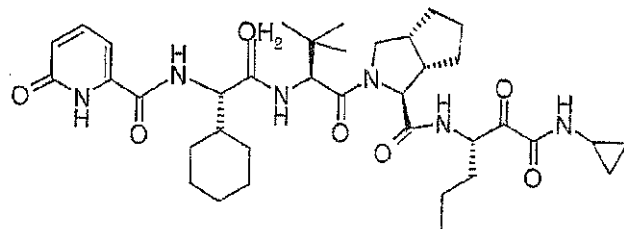
DX, *



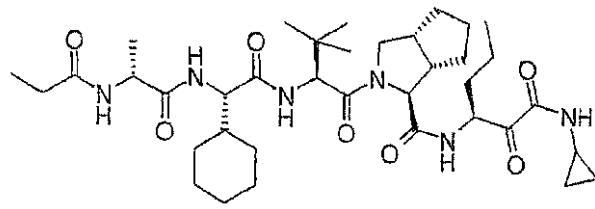
DY, *



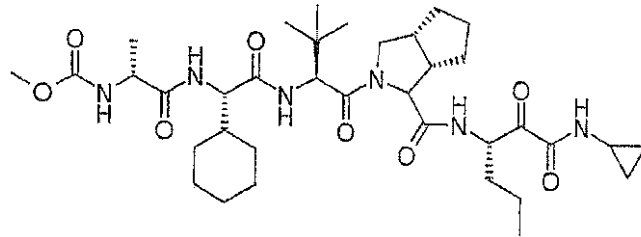
DZ, *



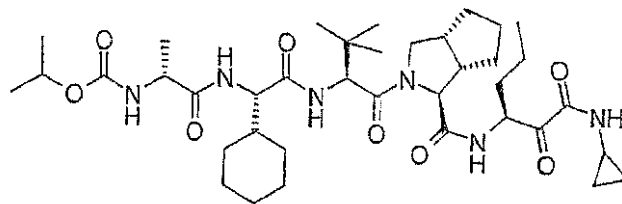
EA, *



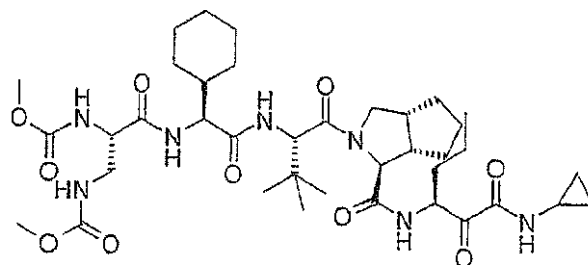
EB, *



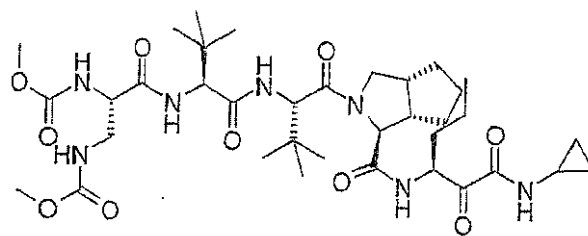
EC, *



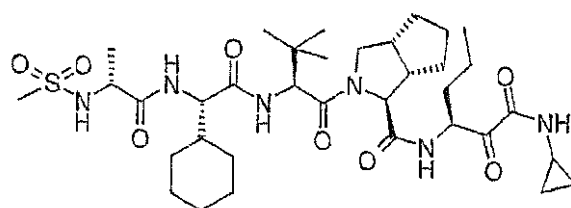
ED, *



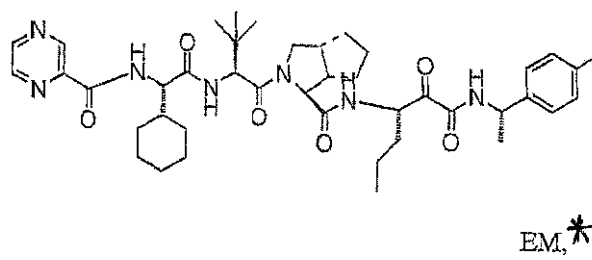
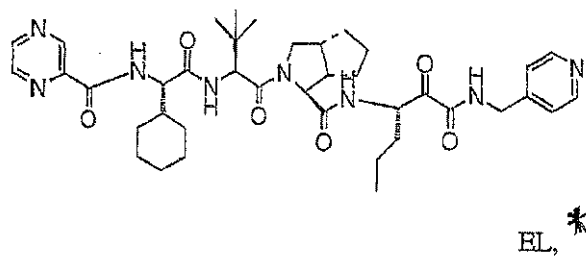
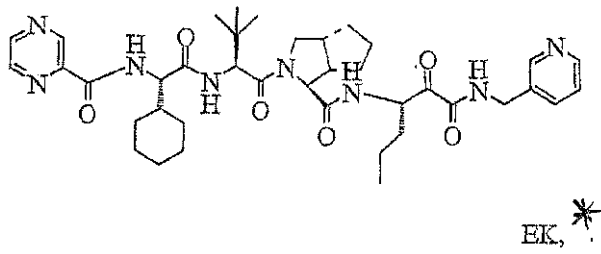
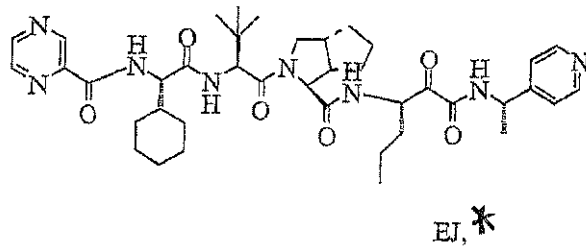
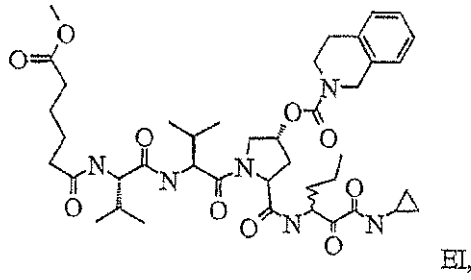
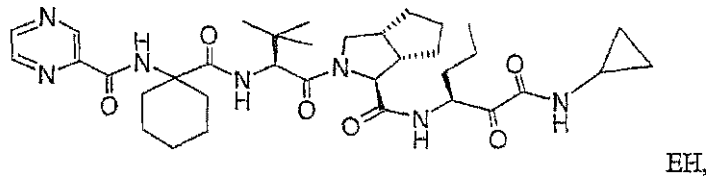
EE, *

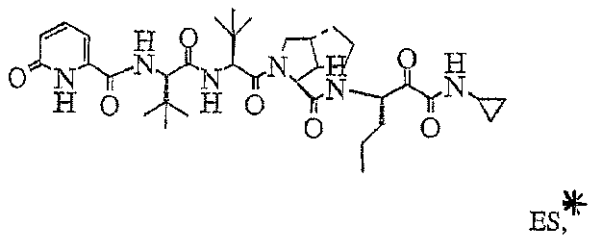
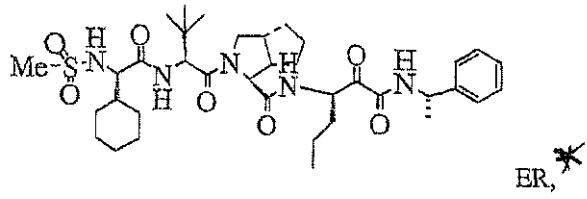
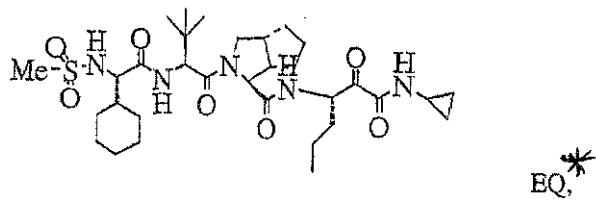
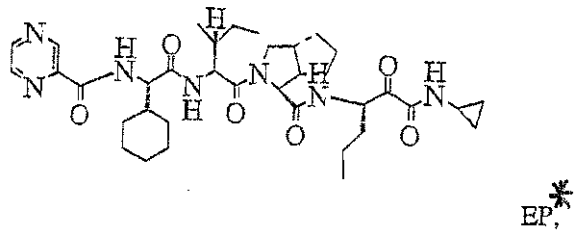
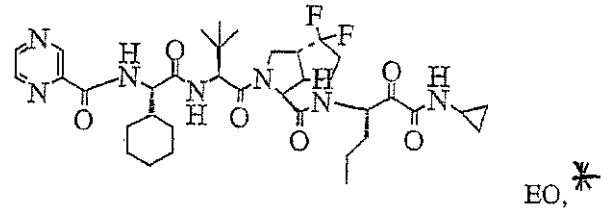
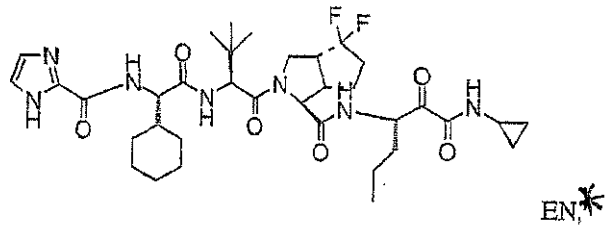


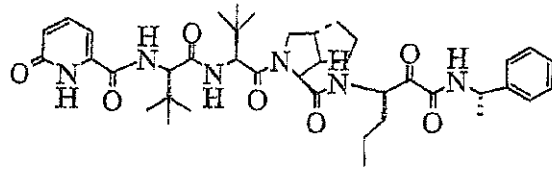
EF, *



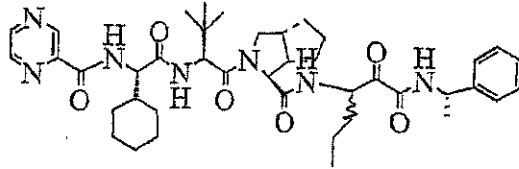
EG, *



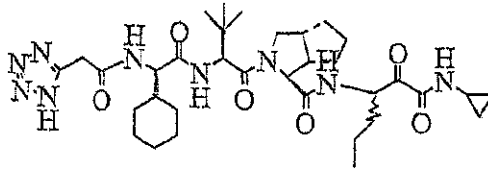




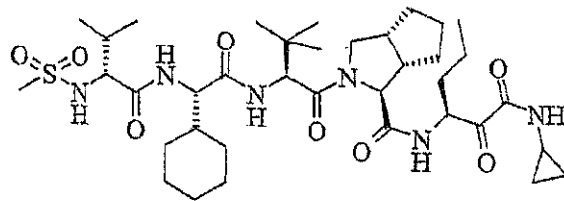
ET, *



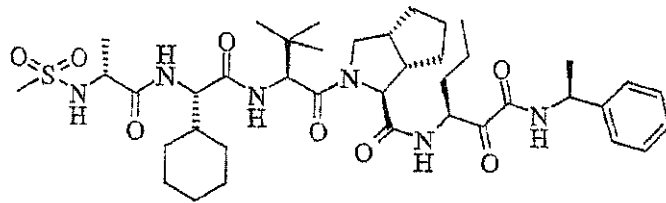
EU, *



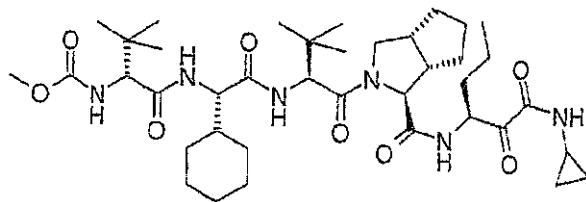
EV, *



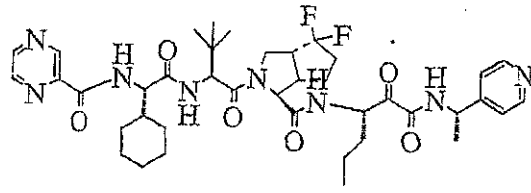
EW, *



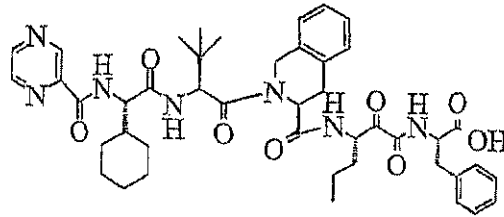
EX, *



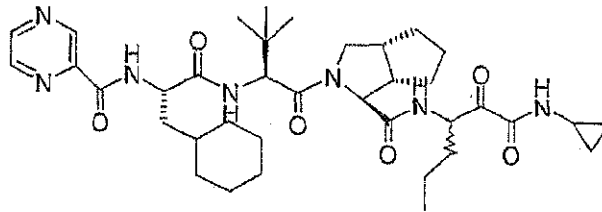
EY, *



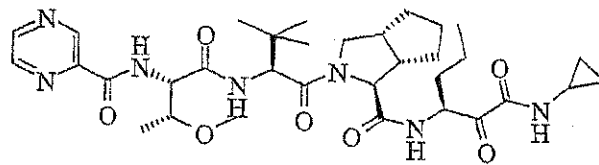
EZ, *



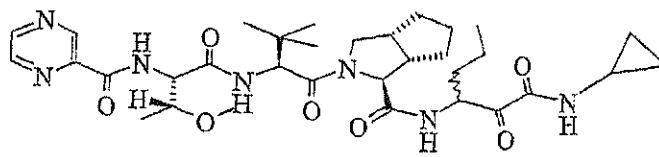
FA, *



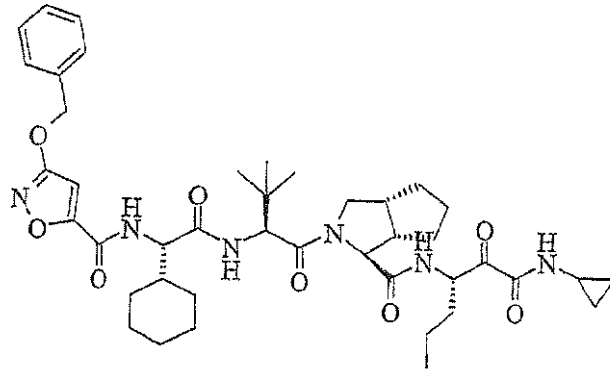
FB, *



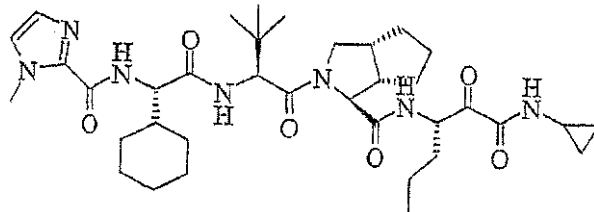
FC, *



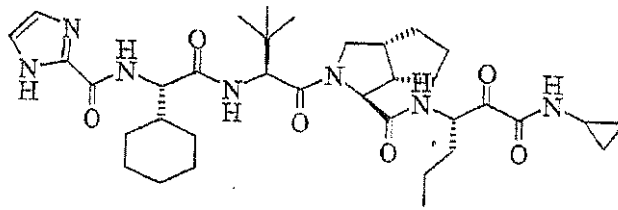
FD, *



FE, *

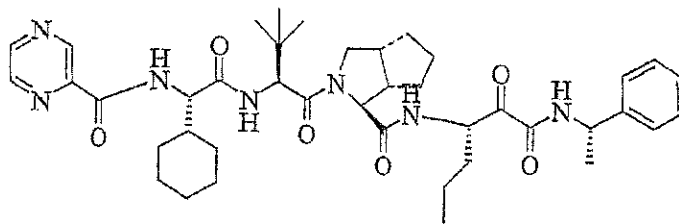


FF, *



FG, *

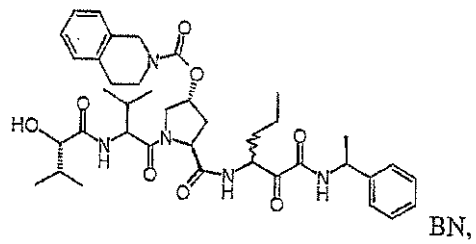
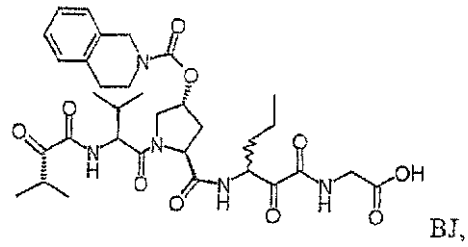
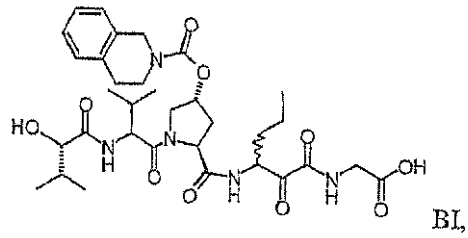
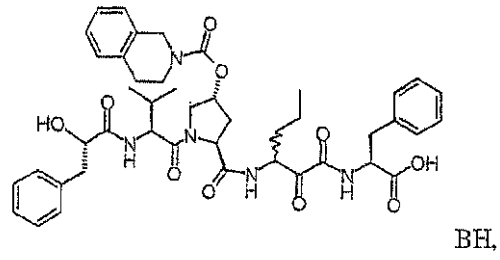
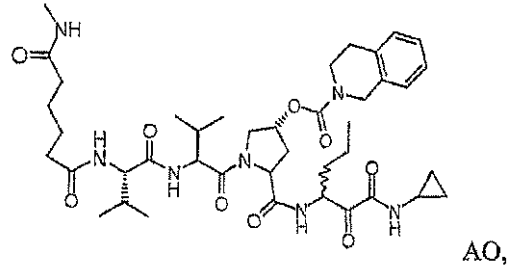
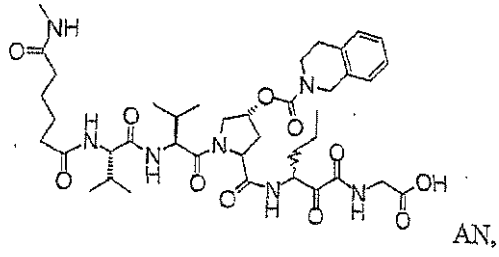
y

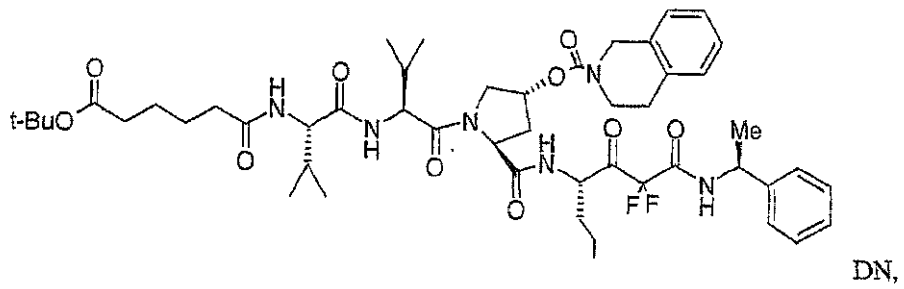
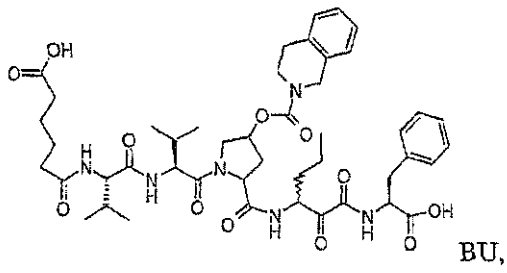
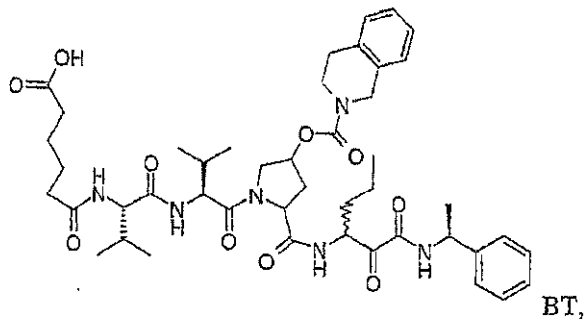
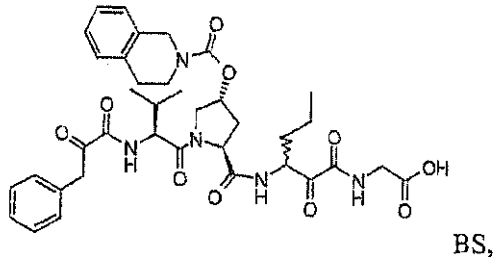
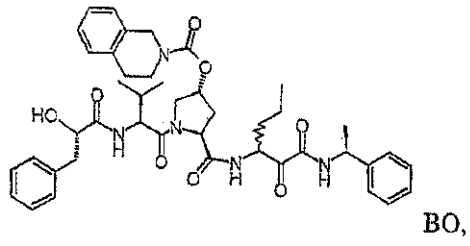


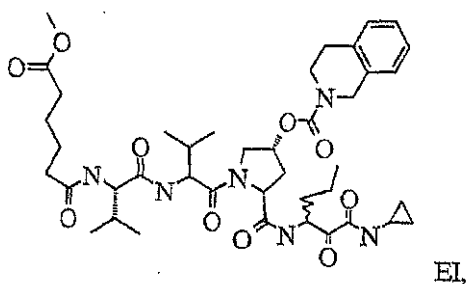
FH, *

5 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco de los mismos, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal o su profármaco.

Otra realización preferente de la invención son compuestos seleccionados entre el siguiente grupo de compuestos:

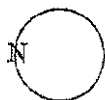






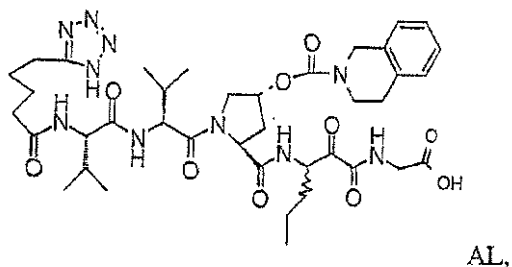
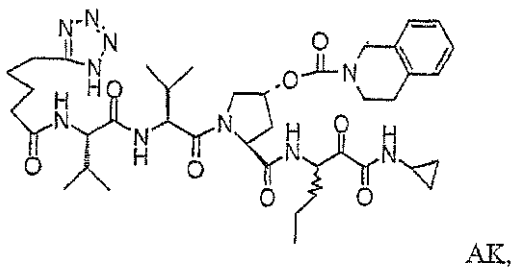
o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco de los mismos, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal o su profármaco.

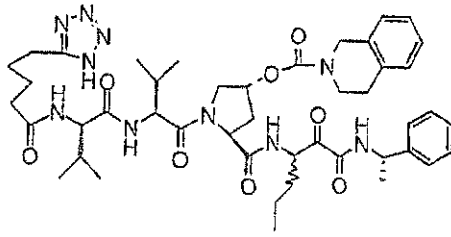
- 5 Otra realización preferente de la invención es un compuesto de fórmula 1 en la que: R⁰ es un enlace;
 R¹ es hidrógeno;
 R² es alquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático; o cicloalquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;
 R³ y R⁵ son cada uno independientemente metileno opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático;
 10 R⁴, R⁶, R⁸ y R¹⁰ son hidrógeno;
 R⁷ es metileno sustituido con cicloalquilo, alquilo o arilo inferior; o (1,1- o 1,2-) cicloalqueno opcionalmente sustituido con cicloalquilo, alquilo inferior o arilo;
 R⁹ es alquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático; o heteroarilo opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;
 15 o heterocíclico opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;



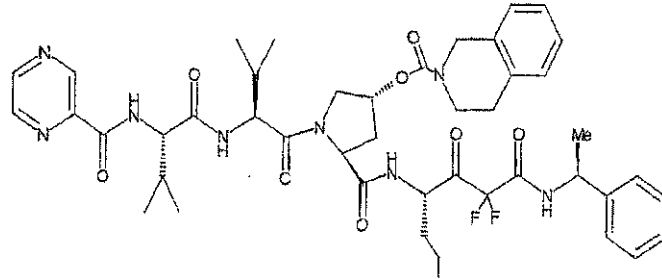
es azaheterociclilo monocíclico opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico; y L es -C(O)-, -OC(O)-.

Otra realización preferente de la invención es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

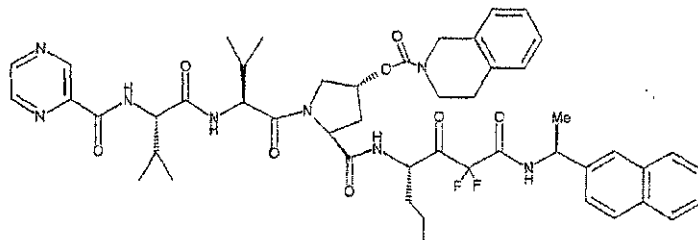




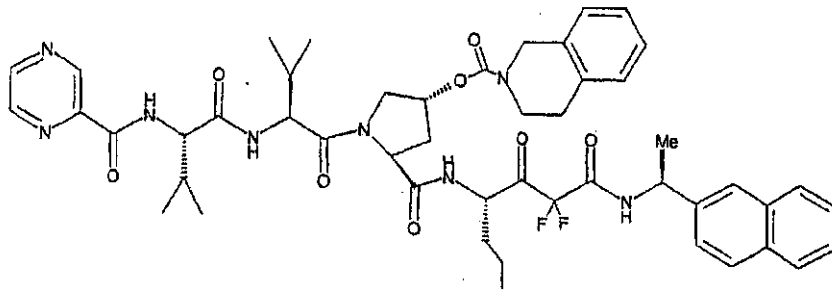
AM,



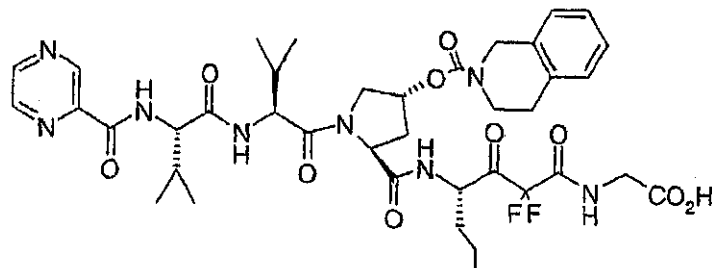
DK,



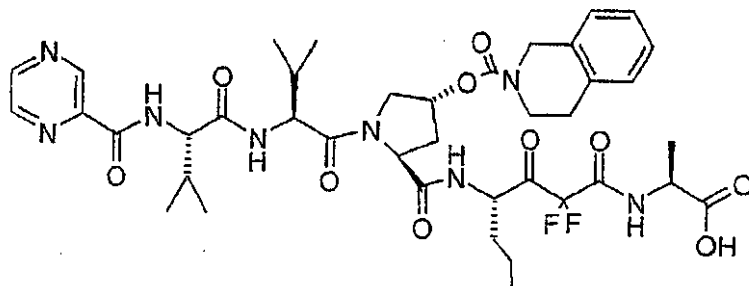
DL,



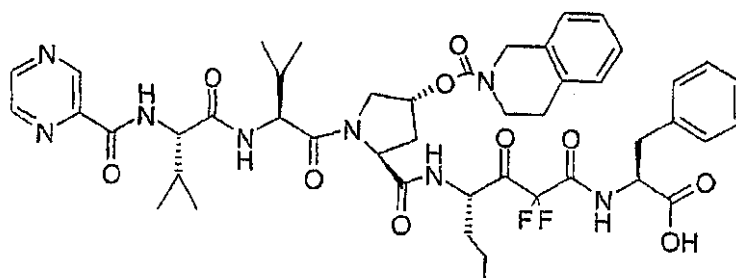
DM,



DO,



DP,



DQ,

o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco de los mismos, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal o su profármaco.

5 Otra realización preferente de la invención es un compuesto de fórmula 1 en la que el grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido de R⁹ está sustituido con al menos un sustituyente de heteroarilo.

Otra realización preferente de la invención es un compuesto de fórmula 1 en la que el grupo aromático opcionalmente sustituido de R⁹ es heteroarilo opcionalmente sustituido.

10 Otra realización preferente de la invención es un compuesto de fórmula 1 en la que el grupo alifático opcionalmente sustituido de R⁹ es alquilheteroarilo opcionalmente sustituido.

Otra realización preferente de la invención es un compuesto en el que el heteroarilo opcionalmente sustituido de R⁹ es pirazinilo, tetrazolilo, quinolinilo, imidazolilo, isoxazolilo y piradonilo, opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo de anillo

15 Los compuestos de la invención opcionalmente se suministran en forma de sales. Aquellas sales que son farmacéuticamente aceptables son de particular interés ya que son útiles para administrar los compuestos anteriores con fines médicos. Las sales que no son farmacéuticamente aceptables son útiles en procesos de fabricación, con fines de aislamiento y purificación, y en algunos casos, para su uso en la separación de formas estereoisoméricas de los compuestos de la presente invención. Esto último es particularmente cierto para sales amina preparadas a partir de aminas ópticamente activas.

20 Cuando el compuesto de la invención contiene un grupo carboxi, o un bioisómero suficientemente ácido, pueden formarse sales de adición de bases y son simplemente una forma más conveniente para su uso; y en la práctica, el uso de la forma salina equivale de forma inherente el uso de la forma de ácido libre.

25 Además, cuando el compuesto de la invención contiene un grupo básico, o un bioisómero suficientemente básico, pueden formarse sales de adición de ácidos y son simplemente una forma más conveniente para su uso; y en la práctica, el uso de la forma salina equivale de forma inherente el uso de la forma de base libre.

Una realización preferida de la presente invención es el uso de los compuestos de la invención para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección que comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula 1.

30 Otra realización preferida es el uso de los compuestos de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula 1 en combinación con una cantidad farmacéuticamente eficaz de otro agente terapéutico anti-HCV al paciente.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden, además de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV, uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que es eficaz, en sí y por sí misma, para su utilización en una terapia de combinación beneficiosa porque incluye una pluralidad de ingredientes activos que pueden utilizarse de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona kits o embalajes individuales que combinan dos o más ingredientes activos útiles en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente. Un kit puede proporcionar (solo o en combinación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable), el compuesto de fórmula 1 y el ingrediente activo adicional (solo o en combinación con diluyente o vehículo) de otro agentes terapéutico anti-HCV.

Los compuestos de fórmula 1 pueden prepararse mediante la aplicación o adaptación de procedimientos conocidos usados hasta ahora o descritos en la bibliografía, o por procedimientos de acuerdo con la presente invención en el presente documento.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV; uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV; y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV.

Otro objeto de la presente invención es el uso de uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV en combinación con uno o más interferones que muestran actividad anti-HCV y/o uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV, para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente que lo necesite.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit o embalaje farmacéutico para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por HCV en un paciente, en el que el kit o embalaje farmacéutico comprende una pluralidad de recipientes diferentes, en el que al menos uno de dichos recipientes contiene uno o más inhibidores de la serina proteasa de HCV, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más interferones o compuestos que inducen la producción de un interferón que muestra actividad anti-HCV (solo o en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable) y, opcionalmente, al menos otro de dichos recipientes contiene uno o más compuestos que tienen actividad anti-HCV (solo o en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable), incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citoquinas inmunoestimuladoras que muestran actividad antiviral de HCV.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en una célula in vitro, que comprende poner en contacto dicha célula, un inhibidor de la serina proteasa del virus de la hepatitis C y, opcionalmente, un interferón o compuestos que inducen la producción de un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C.

La cantidad del inhibidor o inhibidores de la serina proteasa de HCV, interferón o interferones, o compuesto o compuestos anti-HCV en cualquiera de las aplicaciones anteriores puede ser una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad eficaz anti-HCV subóptima, o combinaciones de las mismas, siempre que la combinación final de inhibidor o inhibidores de proteasa de HCV, interferón o interferones, y/o compuesto o compuestos anti-HCV comprenda una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos que sea eficaz en el tratamiento o prevención de infección por HCV en un paciente.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar un compuesto bicicloprolinato quirral que sea útil en la preparación del compuesto de fórmula 1.

Preparación de Compuestos de la invención

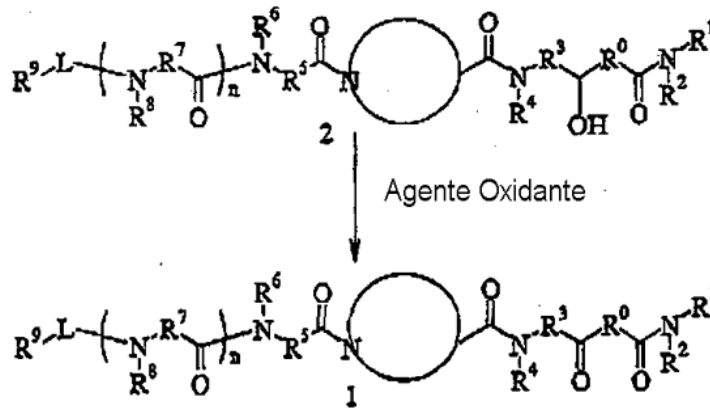
Los materiales de partida y productos intermedios de compuestos de la invención pueden prepararse por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo métodos tal como se describe en los Ejemplos de Referencia o sus equivalentes químicos obvios.

Los compuestos de la invención pueden prepararse por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, mediante lo que pretende indicarse métodos que se han usado hasta ahora en el presente documento o que se describen en la bibliografía, por ejemplo los que se describen por R. C. Larock en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH publishers (1989).

Un compuesto de fórmula 1, en el que las variables y el resto



del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante el tratamiento de un compuesto de fórmula 2, en el que las variables



5

y el resto



del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de oxidación apropiado y en condiciones apropiadas. Un agente de oxidación particular es reactivo de DMP. Las condiciones particulares incluyen llevar a cabo la oxidación en un disolvente orgánico apropiado, tal como diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente.

10

Un compuesto de fórmula 2, en el que las variables y el resto

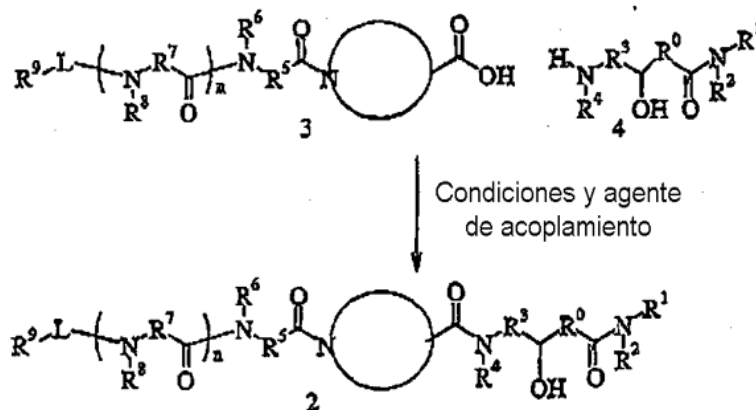


del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante el acoplamiento de un compuesto de fórmula 3, en el que las variables y el resto

15

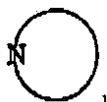


del mismo son tal como se describe en el presente documento, y un compuesto de fórmula 4, en el que las variables

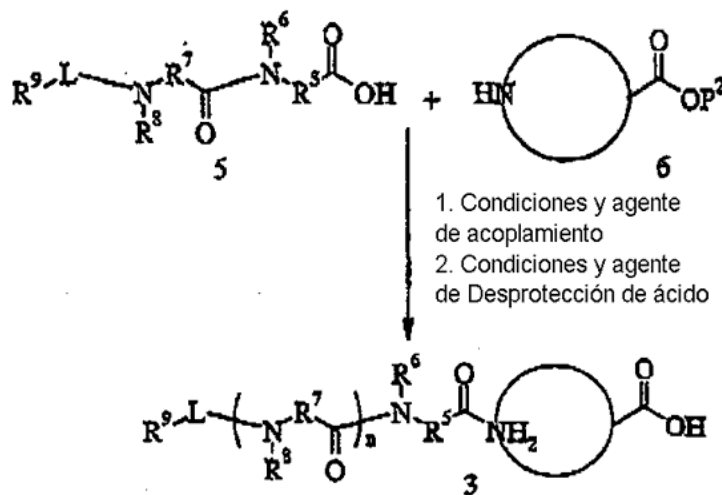


5 del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de acoplamiento apropiado y en condiciones apropiadas. Las condiciones y el agente de acoplamiento particulares incluyen el uso de DIC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF a aproximadamente 0 °C o el uso de PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado, tal como diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente.

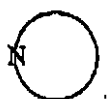
Un compuesto de fórmula 3, en el que las variables y el resto



10 del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante el acoplamiento de un compuesto de fórmula 5, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, y un compuesto de fórmula 6, en la que P² es un grupo protector de ácido



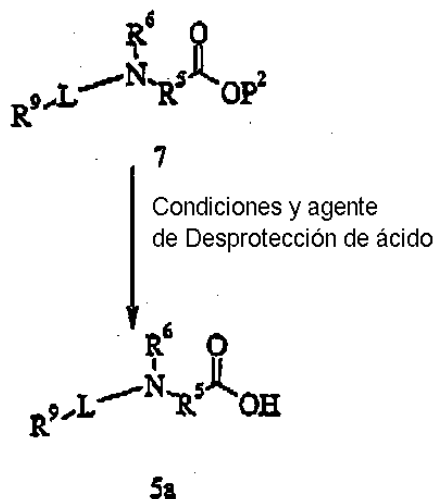
Y el resto



15 del mismo es tal como se describe en el presente documento, con un agente de acoplamiento apropiado y en condiciones de acoplamiento apropiadas, seguido de un agente de desprotección apropiado y en condiciones de desprotección apropiadas. Las condiciones y el agente de acoplamiento particulares incluyen el uso de DIC o DCC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF o diclorometano a de aproximadamente 0 °C a aproximadamente temperatura ambiente. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente de protección, es decir, si este es retirable (lábil) bajo condiciones de

5 ácido, de base o de hidrogenación, y otros restos reactivos en el compuesto que se está sometiendo a desprotección, es decir, un agente de desprotección se elige para llevar a cabo la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción concomitante. Un agente de protección de ácido particular es alquilo inferior C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares engloban llevar a cabo la desprotección en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 5, en la que n es 0 y las otras variables son tal como se describe en el presente documento, es decir, el compuesto 5a, puede prepararse mediante la desprotección de un compuesto de fórmula 7,

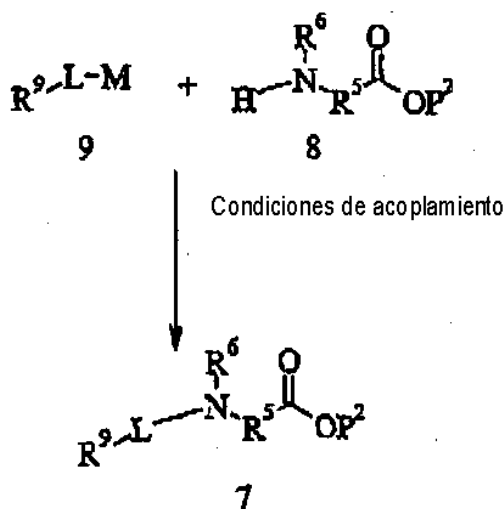


10 en la que P² es un ácido grupo protector y las otras variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente de protección, es decir, si este es retirable (lábil) bajo condiciones de ácido, de base o de hidrogenación, y otros restos reactivos en el

15 compuesto que se está sometiendo a desprotección, es decir, un agente de desprotección se elige para llevar a cabo la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción concomitante. Un agente de protección de ácido particular es alquilo inferior C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares engloban llevar a cabo la desprotección en un disolvente alcohólico, tal

20 como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente.

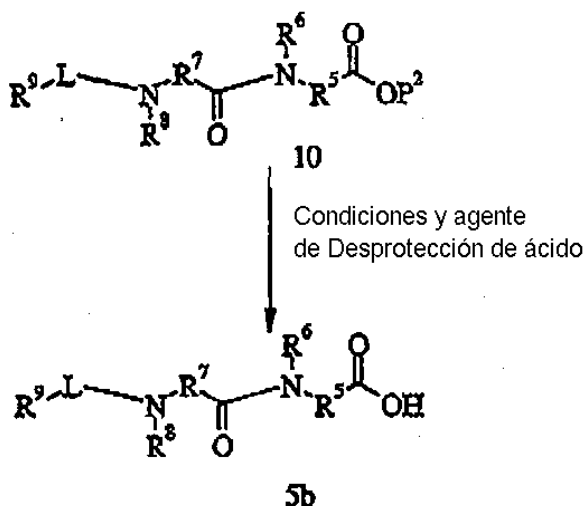
Un compuesto de fórmula 7, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la acilación de un compuesto de fórmula 8, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un compuesto de fórmula 9, en la que M es un resto desplazable y las otras variables



25

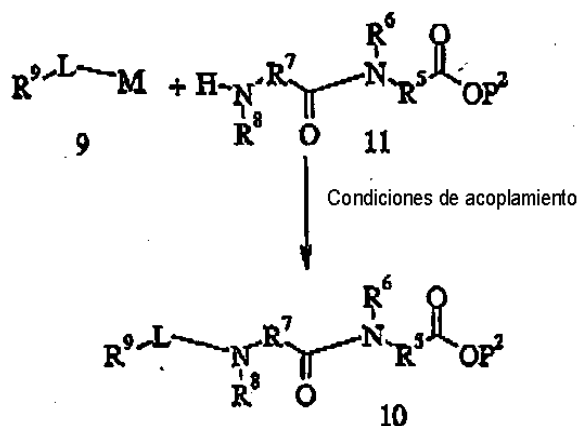
del mismo son tal como se describe en el presente documento, bajo condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan DIC o DCC y HOAt en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF o diclorometano a de aproximadamente 0 °C a aproximadamente temperatura ambiente, o PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF o diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente; y preferentemente estas últimas condiciones. Un L particular es carbonilo. Un M particular es hidroxilo o N-oxisuccinimida.

Un compuesto de fórmula 5, en la que n es 1 y las otras variables son tal como se describe en el presente documento, es decir, el compuesto 5b, puede prepararse mediante la desprotección de un compuesto de fórmula 10, en la que P² es



un grupo protector de ácido y las otras variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente de protección de ácido es decir, si este es retirable (lábil) bajo condiciones de ácido, de base, o de hidrogenación, y otros restos reactivos en el compuesto que se está sometiendo a desprotección, es decir, un agente de desprotección se elige para llevar a cabo la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción concomitante. Un agente de protección de ácido particular es alquilo inferior C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares engloban llevar a cabo la desprotección en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente.

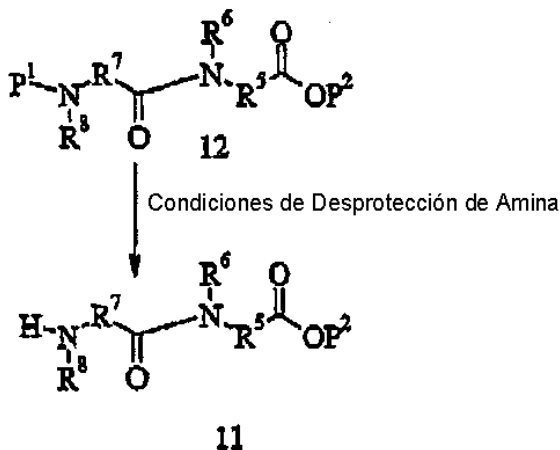
Un compuesto de fórmula 10, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la acilación de un compuesto de fórmula 11, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un compuesto de fórmula 9, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento,



bajo condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan DIC o DCC y HOAT en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF o diclorometano a de aproximadamente 0 °C a aproximadamente

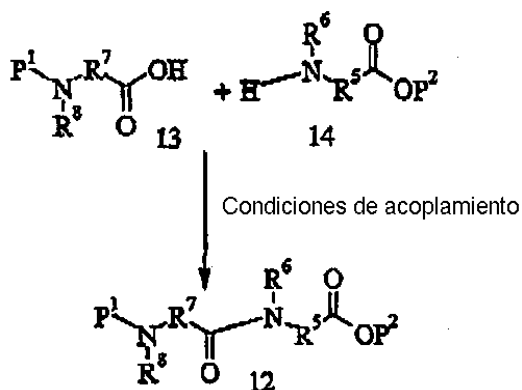
temperatura ambiente, o PyBop y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado, tal como DMF o diclorometano aproximadamente a la temperatura ambiente; y preferentemente estas últimas condiciones. Un L particular es carbonilo. Un M particular es hidroxilo o N-oxisuccinimida.

5 Un compuesto de fórmula 11, en la que las variables son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la desprotección de un compuesto de fórmula 12, en la que P¹ es un grupo protector de amina



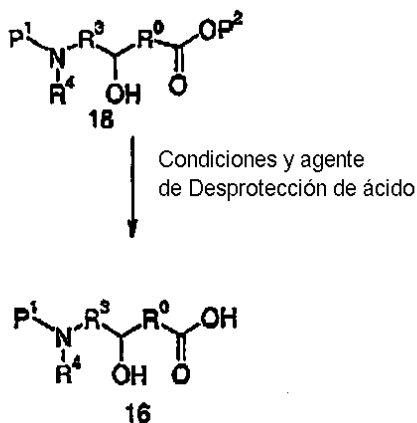
10 y las otras variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente de protección de amina, es decir, si este es retirable (lábil) bajo condiciones de ácido, de base o de hidrogenación, y otros restos reactivos en el compuesto que se está sometiendo a desprotección, es decir, un agente de desprotección se elige para llevar a cabo la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción concomitante. Un agente de protección de amina particular es Cbz o BOC; más particularmente Cbz. Un agente de desprotección particular es ácido tal como HCl o H₂/Pd(OH)₂; más particularmente H₂/Pd(OH)₂. Las condiciones de desprotección particulares engloban llevar a cabo la desprotección en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol o un disolvente de alcanato de alquilo tal como acetato de etilo a aproximadamente temperatura ambiente.

15 Un compuesto de fórmula 12, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante el acoplamiento de un compuesto de fórmula 13, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un compuesto de fórmula 14, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento,



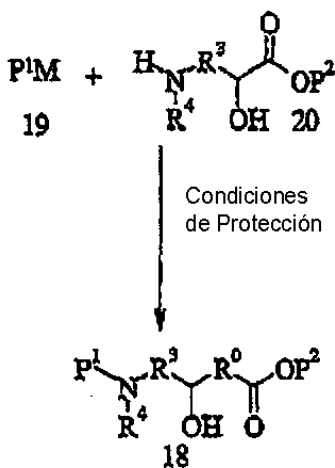
bajo condiciones apropiadas. Las condiciones de acoplamiento particulares usan HOAt/DIC y DIPEA en un disolvente orgánico apropiado, tal como THF a aproximadamente temperatura ambiente.

25 Un compuesto de fórmula 4, en el que las variables son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la desprotección de un compuesto de fórmula 15, en el que las variables del mismo son



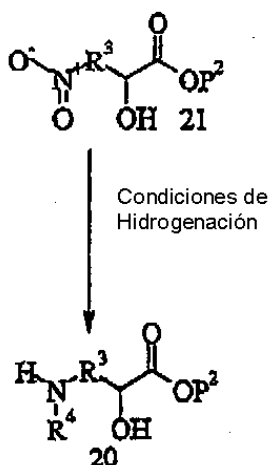
tal como se describe en el presente documento, con un agente de desprotección apropiado y en condiciones apropiadas. La desprotección se realiza usando un agente de desprotección apropiado que depende de la naturaleza del agente de protección de ácido, es decir, si este es retirable (lábil) bajo condiciones de ácido, de base o de hidrogenación, y otros restos reactivos en el compuesto que se está sometiendo a desprotección, es decir, un agente de desprotección se elige para llevar a cabo la desprotección sin afectar a los otros restos reactivos a menos que se desee una reacción concomitante. Un agente de protección de amina particular es Cbz. Un agente de protección de ácido particular es alquilo inferior C₁ a C₈; más particularmente metilo. Un agente de desprotección particular es una base inorgánica tal como un hidróxido alcalino; más particularmente NaOH. Las condiciones de desprotección particulares engloban llevar a cabo la desprotección en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 18, en la que R⁰ es un enlace y las otras variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la protección de un compuesto de fórmula 20, que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un compuesto de fórmula 19, en el que, las variables



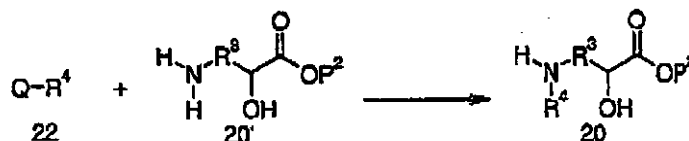
del mismo son tal como se describe en el presente documento, bajo condiciones apropiadas. Un agente de protección de amina particular es Cbz o BOC. Las condiciones de acoplamiento particulares usan un disolvente orgánico apropiado, tal como diclorometano a de aproximadamente 0 °C a aproximadamente temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 20, en la que R⁴ es hidrógeno y las otras variables son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la hidrogenación de un compuesto de fórmula 21, en el que las variables



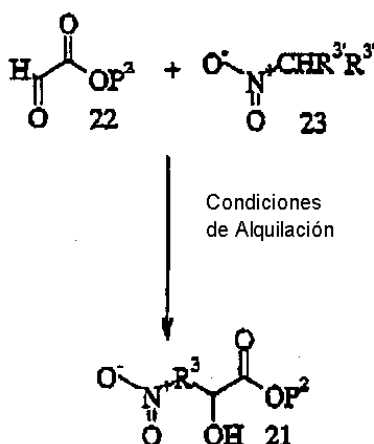
del mismo son tal como se describe en el presente documento, con un agente de hidrogenación apropiado y en condiciones apropiadas. Un agente de hidrogenación particular es $H_2/Pd(OH)_2$. Las condiciones de hidrogenación particulares engloban llevar a cabo la hidrogenación en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol o un disolvente de alcanato de alquilo tal como acetato de etilo a aproximadamente temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 20 en la que R^4 es un grupo alifático opcionalmente sustituido y las otras variables son tal como se describe en el presente documento puede prepararse mediante la alquilación del compuesto 20' en el que las variables son tal como se describe en el presente documento con el compuesto 22 (agente de alquilación) en el que R^4 es un grupo alifático opcionalmente sustituido y Q es un grupo desplazable tal como un haluro, tosilato o sulfonato, bajo condiciones apropiadas.



Los agentes de alquilación apropiados incluyen alifático (haluros, tosilatos o sulfonatos). Las condiciones de alquilación apropiadas engloban llevar a cabo una alquilación en un disolvente orgánico apropiado, tal como un disolvente alcohólico, por ejemplo, metanol o etanol, o disolvente etéreo, por ejemplo, éter o tetrahidrofurano a aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente reflujo.

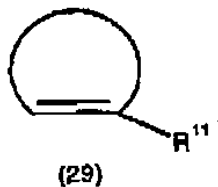
Un compuesto de fórmula 21, en el que las variables son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la alquilación de un compuesto de fórmula 22, en el que la variable del mismo es tal como se describe en el presente documento, con un compuesto de fórmula 23, en la que los R^3 independientemente son



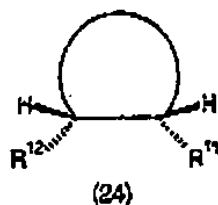
grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido tal como se describe en el presente documento, bajo condiciones apropiadas. Las condiciones de alquilación particulares engloban llevar a cabo la alquilación usando una base fuerte tal como t-butoxido de potasio en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente. disolvente

alcohólico tal como metanol o etanol a aproximadamente temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula 24 en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse efectuando una adición de Michael sobre un aceptor de Michael de fórmula 29, en el que la variable del mismo es tal como se describe en el presente documento, con un derivado de glicinimida imínica.

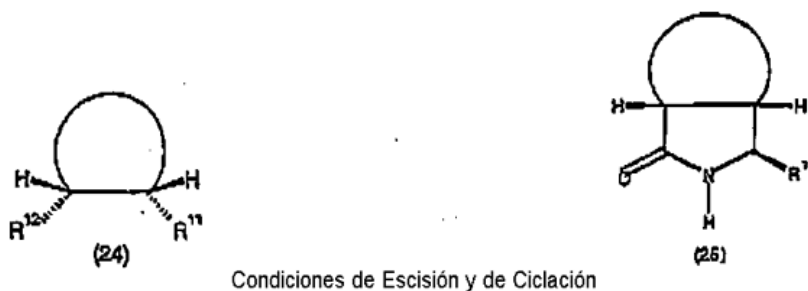


↓ Condiciones de Adición de Michael



5 Las adiciones de Michael comprenden disolventes polares apróticos apropiados, bases de hidróxido de metilo alcalino, y temperaturas apropiadas. Para adiciones de Michael, véase Corey, E. J.; Noe, M. C.; Xu, F. Tetrahedron Letter 1998, 39, 5347. Para la síntesis de catalizadores de transferencia de fase quiral, véase Corey, E. J.; Noe, MLC.; Xn, F. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 12414. Los disolventes apropiados incluyen DCM, ACN, o THF dependiendo de las condiciones de reacción. Las bases apropiadas incluyen CsOH, NaOH, KOH, y LiOH. Las temperaturas apropiadas varían de aproximadamente -78 °C a aproximadamente 0 °C, más particularmente a aproximadamente -60 °C. Las glicinimidas imínicas útiles en la invención se describen en el presente documento. Una glicinimida imínica preferente es éster terc-butílico de N-(difenilmetileno)glicina. Además, las condiciones de adición de Michael pueden verse afectadas con o sin un catalizador de transferencia de fase (PTC) (quiral y no quiral). Un PTC preferente es bromuro de O-[9]alil-W-9-antracnilmetilcinconidio,

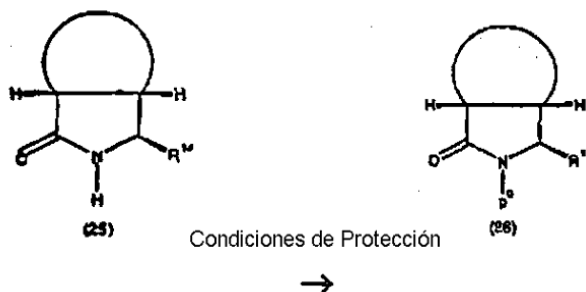
Un compuesto de fórmula 25, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante escisión y ciclación de imina del compuesto de fórmula 24.



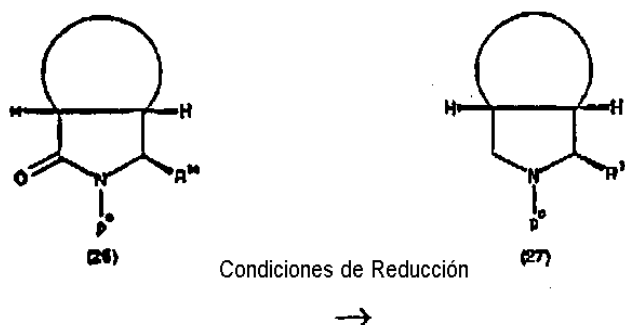
20 Para los procedimientos de escisión y ciclación, véase Javidan, A.; Schfer, K.; Pyne, S. Synlett 1996, 100; Tatsukawa, A.; Dan, M.; Ohbatake, M.; Kawatake, K.; Fukata, T.; Wada, E.; Kanemase, S.; Kakei, S. J. Org. Chem. 1993, 58, 4221. Las condiciones de escisión y ciclación incluyen el uso de disolventes polares, reactivos de ácido, y temperaturas de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 150 °C. Las condiciones preferentes incluyen el uso de EtOH, AcONa y NH₂OH.HCl, y una temperatura de aproximadamente punto de ebullición para el disolvente usado.

25 Un compuesto de fórmula 26, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la protección de la amida del compuesto de fórmula 25, en el que las variables del

- 5 mismo son tal como se describe en el presente documento, con un grupo protector de amida adecuado tal como BOC. Otros grupos protectores adecuados incluyen CBz, $-\text{CO}_2$ -alquilo. Así mismo, véase Greene, T. W.; P. G. M. en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, 1991 para otros grupos protectores de amina. Las condiciones de protección incluyen el uso de disolventes polares apróticos, bases orgánicas como catalizadores, y temperaturas de aproximadamente $0\text{ }^\circ\text{C}$ - $100\text{ }^\circ\text{C}$. Las condiciones preferentes incluyen el uso de ACN, dimetil amino piridina, y una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente.



- 10 Un compuesto de fórmula 27, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la reducción del compuesto protegido de fórmula 26, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento.



- 15 De hecho, se realizan dos reducciones. La primera reducción es de la amida a un hemiaminal usando DIBALH o super-hidruro $[\text{LiBEt}_3\text{H}]$. La segunda reducción es del hemiaminal a la amina usando Er_3SiH y $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$. Véase Collado, I; Ezquerra, J.; Mateo, A. I.; Rubio, A., J. Org. Chem. 1998, 63 1995-2001 y Ezquerra, J.; Pedregal, C.; Yruretagoyena, B.; Rubio, A.; Carreno, M. C.; Escibano, A.; Garcia Ruano, J. L. J. Org. Chem. 1995, 60, 2925 para las condiciones de reducción. Otras condiciones habituales para convertir piroglutamatos en pirrolidinas es el uso de $\text{BH}_3\text{-SMe}_2$.

- 20 Un compuesto de fórmula 28, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento, puede prepararse mediante la desprotección del compuesto de fórmula 27, en el que las variables del mismo son tal como se describe en el presente documento.



- 25 Véase Gibson, F. G.; Bermeier, S. C.; Rapoport, H., J. Org. Chem. 1994, 59, 3216-3218 para las condiciones para la retirada selectiva de N-BOC grupo protector en presencia de éster terc-butílico. Un experto en la materia sabría que las condiciones de desprotección serán dependientes de la elección del grupo protector. Por ejemplo, si se usa CBz, pueden usarse condiciones de hidrogenación o básicas. Preferentemente, si se usa BOC, puede usarse HCl 1 N en acetato de etilo. Véase Greene, T. W.; P. G. M. en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, 1991.

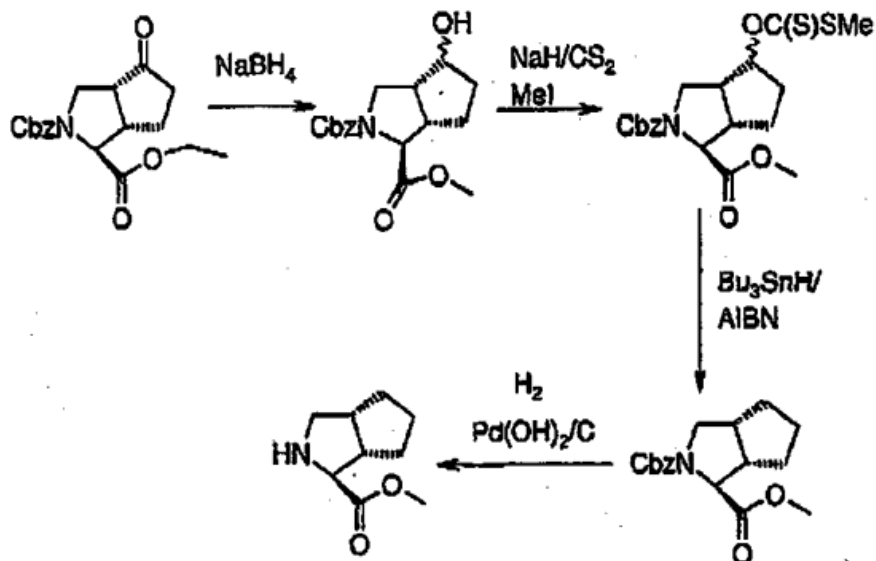
El experto en la materia apreciará que un compuesto de fórmula 3 puede prepararse mediante el acoplamiento de un compuesto de fórmula 5 con un compuesto de fórmula 28 bajo las condiciones que se han descrito en lo que

antecede en el presente documento.

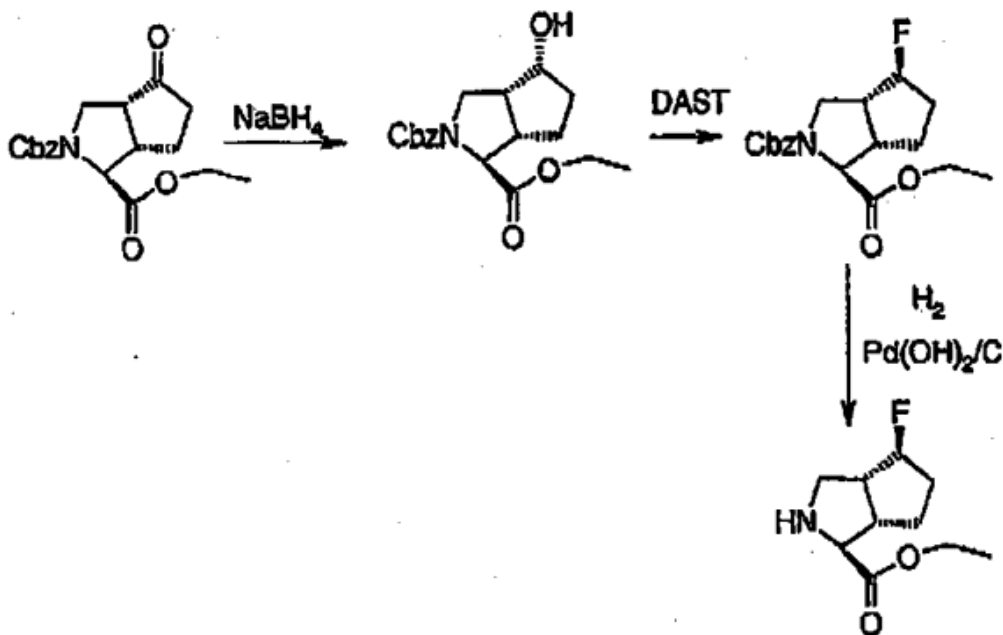
Los métodos para preparar R³, R⁵ o R⁷ como restos de etanodiilo opcionalmente sustituidos incluyen los conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los métodos que se describen en "The organic Chemistry of β -Lactams" editado por G. Georg, VCH Publishers, Inc. (1993), por ejemplo, páginas 240-241 y 303-305.

- 5 Los esquemas 1-11 que siguen ejemplifican métodos variados para preparar un azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido (comparación). Los métodos en los esquemas en lo sucesivo también son aplicables a otros azaheterociclilos multicíclicos opcionalmente sustituidos que comprenden sustituyentes similares compatibles.

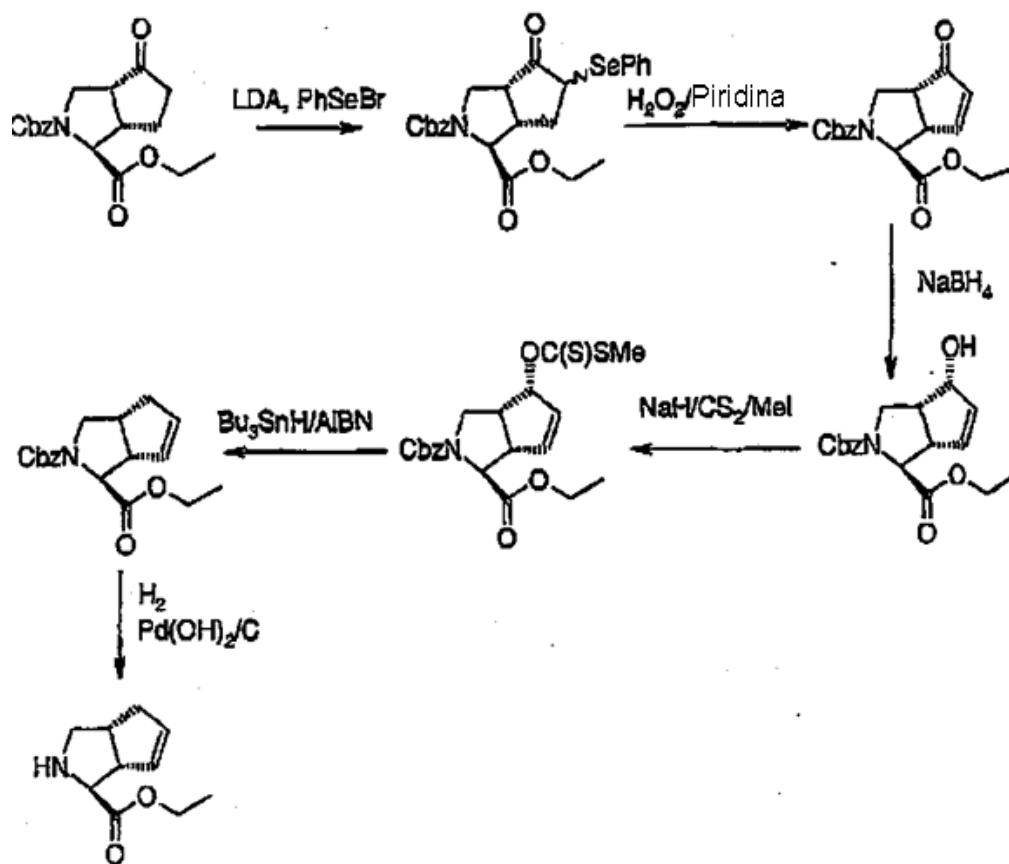
ESQUEMA 1



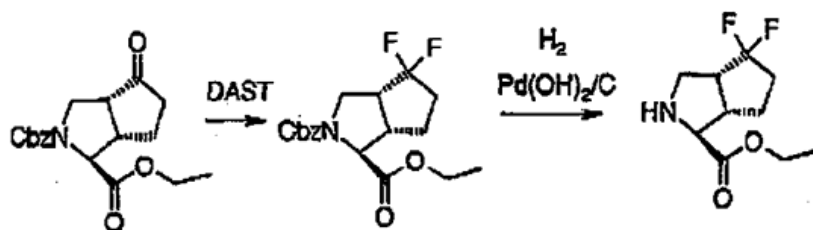
ESQUEMA 2



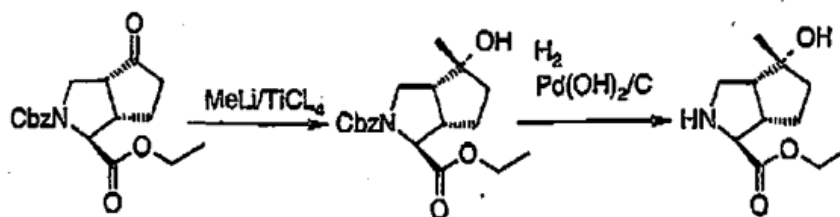
ESQUEMA 3



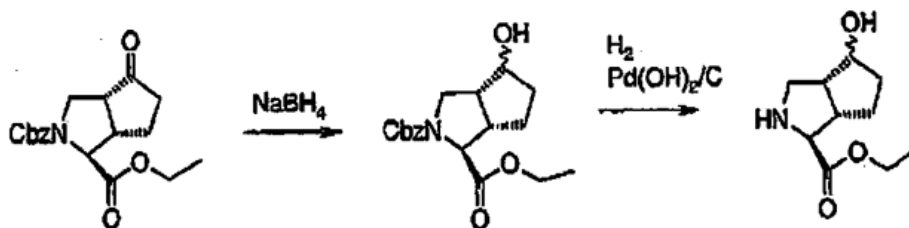
ESQUEMA 4



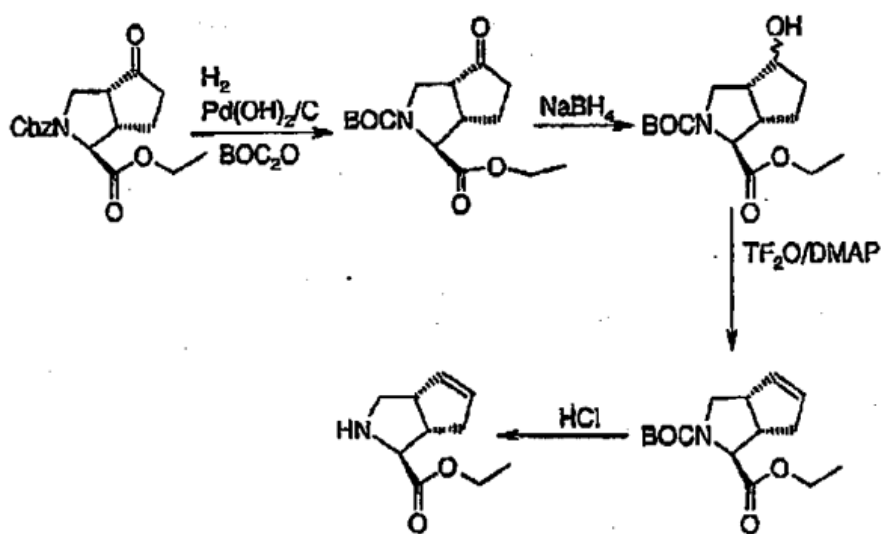
ESQUEMA 5



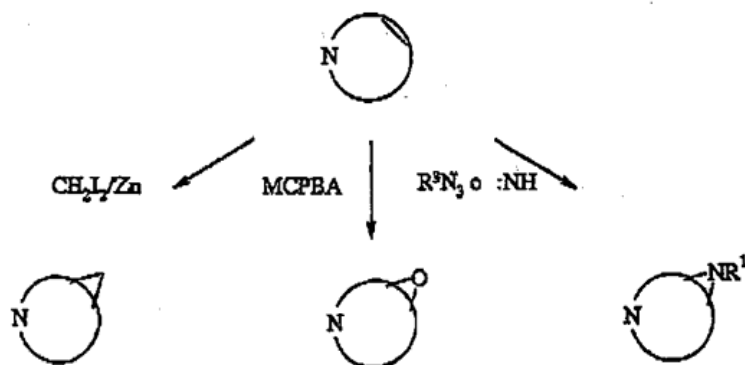
ESQUEMA 6



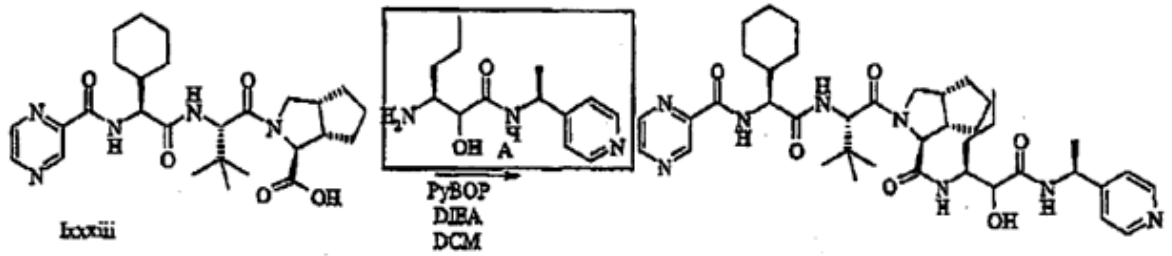
ESQUEMA 7



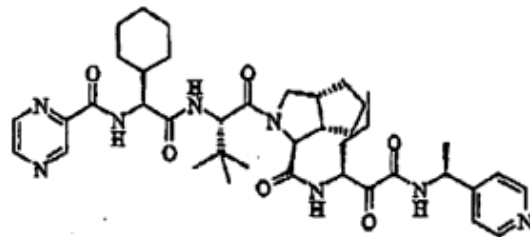
ESQUEMA 8



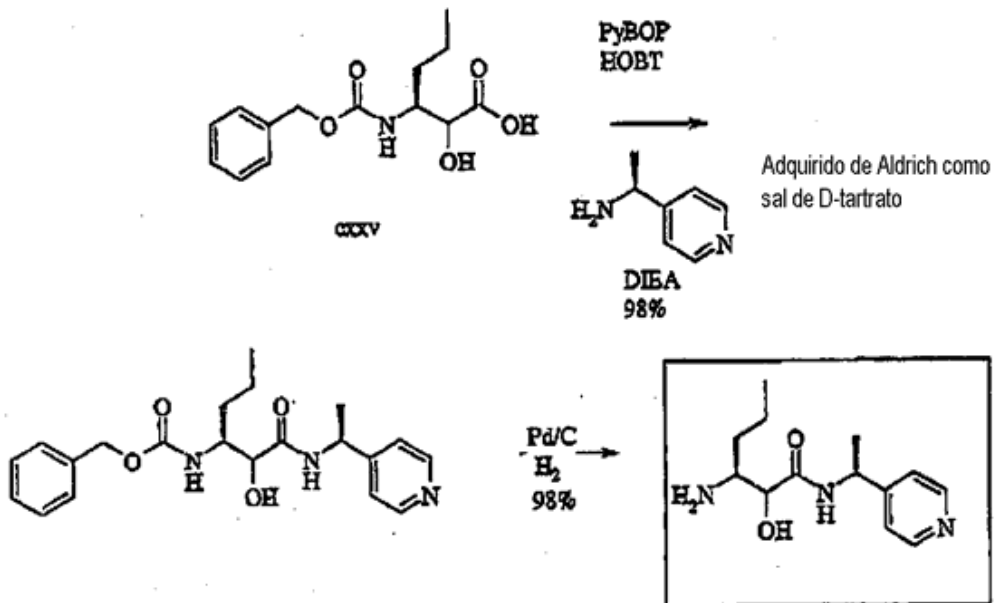
Esquema 9



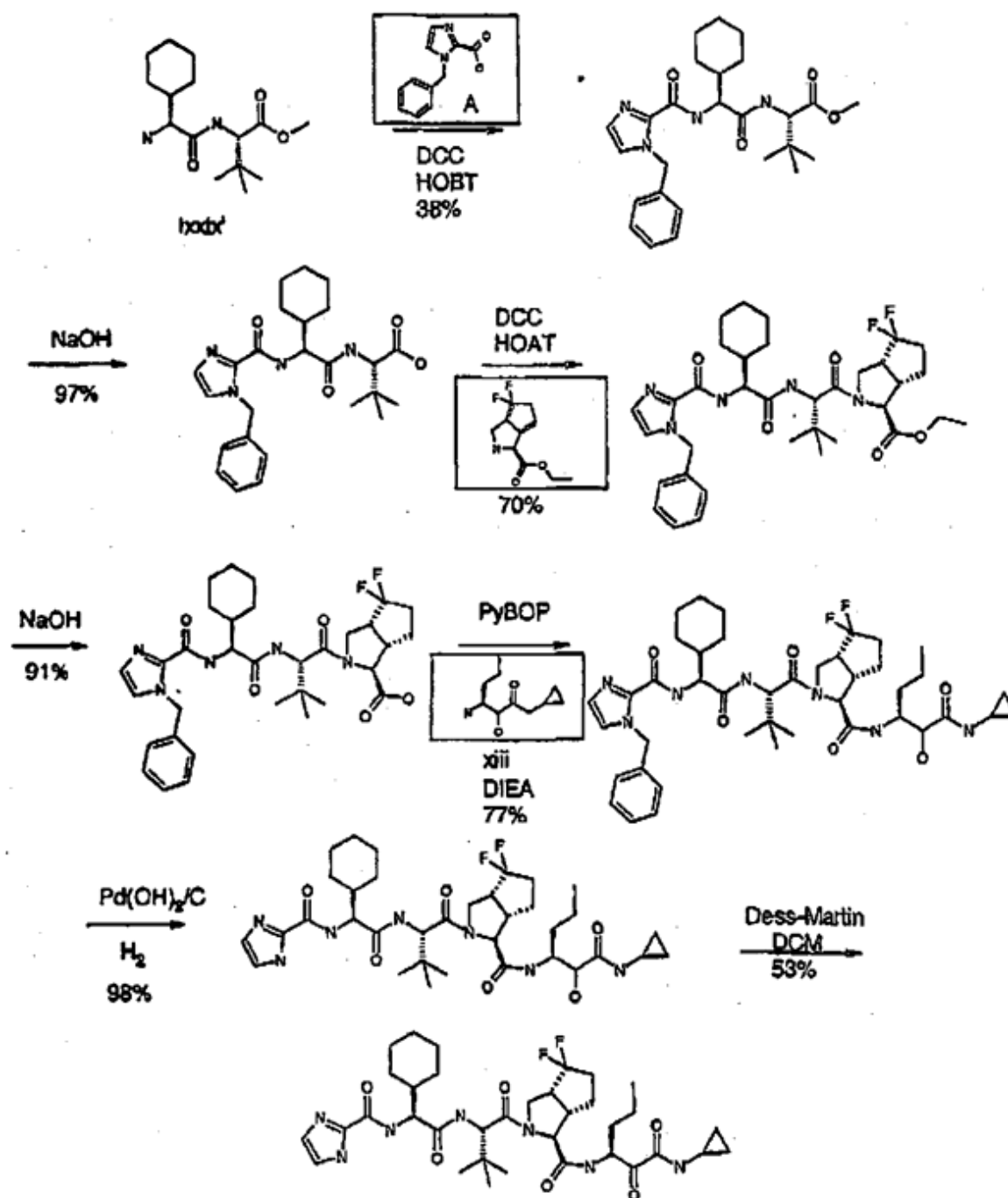
Dess-Martin
 DCM
 33 %
 a lo largo de 2 etapas



ESQUEMA 10



Esquema 11



Un compuesto de fórmula 1 incluyendo un grupo que contiene uno o más átomos de nitrógeno en el anillo, preferentemente imina (=N-), puede convertirse en el compuesto correspondiente en el que uno o más átomos de nitrógeno en el anillo del grupo se oxidan para dar un N-óxido, preferentemente haciendo que reaccionen con un perácido, por ejemplo ácido peracético en ácido acético o ácido m-cloroperoxibenzoico en un disolvente inerte tal como diclorometano, a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente a reflujo, preferentemente a temperatura elevada.

5

En las reacciones que se han descrito en lo que antecede en el presente documento, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, en los que estos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, por ejemplos véase T. W. Green y P. G. M. Wuts en

10

"Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons (1991); J. F. W. McOmie en "Protective Groups in Organic Chemistry" Plenum Press, 1973.

Un compuesto que se prepara tal como se describe en el presente documento puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse mediante la eliminación por destilación del disolvente a partir de la mezcla reactiva o, si es necesario, después de la eliminación por destilación del disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de la extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y la eliminación por destilación del disolvente a partir del extracto. Adicionalmente, si se desea, el producto puede purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tal como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, notablemente cromatografía en columna o cromatografía preparativa de capa fina.

De acuerdo con un elemento distintivo adicional de la presente invención, pueden prepararse compuestos de la invención mediante la interconversión de otros compuestos de la invención.

Como un ejemplo del procedimiento de interconversión, los compuestos de fórmula 1 que contienen enlaces de sulfóxido pueden prepararse mediante la oxidación de compuestos correspondientes que contienen enlaces -S-. Por ejemplo, la oxidación puede realizarse de forma conveniente por medio de reacción con un peroxiácido, por ejemplo, ácido 3-cloroperbenzoico, preferentemente en un disolvente inerte, por ejemplo, diclorometano, preferentemente a o cerca de la temperatura ambiente, o como alternativa por medio de hidrogenoperoxomonosulfato de potasio en un medio tal como metanol acuoso, tamponado a aproximadamente pH 5, a unas temperaturas de entre aproximadamente 0 °C y temperatura ambiente. Este último método es preferente para compuestos que contienen un grupo lábil frente a ácido.

Como otro ejemplo del procedimiento de interconversión, los compuestos de fórmula 1 que contienen enlaces de sulfona pueden prepararse mediante la oxidación de compuestos correspondientes que contienen enlaces -S- o de sulfóxido. Por ejemplo, la oxidación puede realizarse de forma conveniente por medio de reacción con un peroxiácido, por ejemplo, ácido 3-cloroperbenzoico, preferentemente en un disolvente inerte, por ejemplo, diclorometano, preferentemente a o cerca de la temperatura ambiente.

Se entenderá que la designación de aromaticidad con respecto a arilos y heteroarilos en el presente documento incluye cualquier estructura de anillo insaturado sumamente resonante. Como alternativa, la colocación de dobles enlaces, donde se indique, representa una estructura potencial para el compuesto representado pero se entenderá que incluyen otros estados resonantes del compuesto así como especies protonadas y cargadas, solo una de las cuales puede mostrarse.

Se apreciará que compuestos de la presente invención pueden contener centros asimétricos. Estos centros asimétricos pueden encontrarse independientemente o bien en la configuración R o bien en la S. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos compuestos de la invención también pueden mostrar isomería geométrica. Debe apreciarse que la presente invención incluye isómeros geométricos individuales y estereoisómeros y mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, de compuestos de acuerdo con la invención. Tales isómeros pueden separarse de sus mezclas, por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo técnicas cromatográficas y técnicas de recristalización, o estos se preparan por separado a partir de los isómeros apropiados de sus productos intermedios.

Para el fin en el presente documento se entiende que las formas tautoméricas se incluyen en el enunciado de un grupo dado, por ejemplo, tioxo/mercapto u oxo/hidroxilo.

Las sales de adición de ácido se forman con los compuestos de la invención en los que una función básica tal como un grupo amino, alquilamino, o dialquilamino se encuentra presente. Son preferentes las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, es decir, no tóxicas. Las sales elegidas se eligen de forma óptima para ser compatibles con los vehículos farmacéuticos habituales y estar adaptadas para su administración oral o parenteral. Las sales de adición de ácido de los compuestos de la presente invención pueden prepararse por reacción de la base libre con el ácido apropiado, por la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de ácido de los compuestos de la presente invención pueden prepararse o bien mediante la disolución de la base libre en agua o bien solución de alcohol acuosa u otros disolventes adecuados que contienen el ácido apropiado y aislando la sal mediante la evaporación de la solución, o haciendo que reaccionen la base libre y el ácido en un disolvente orgánico, caso en el que la sal se separa directamente o puede obtenerse por concentración de la solución. Algunos ácidos adecuados para su uso en la preparación de tales sales son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, diversos ácidos carboxílicos y sulfónicos orgánicos, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácidos grasos, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, ciclopentanopropionato, digluconato, docecilsulfato, bisulfato, butirato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, glicerofosfato, pirato, pivalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, tiocianato, 2-naftalenosulfonato, undecanoato, nicotinato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, alcanforato, alcanfersulfonato y otros.

Las sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención pueden regenerarse a partir de las sales por la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos originales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de ácido por tratamiento con un álcali, por ejemplo, solución de bicarbonato de sodio acuosa o solución de amoníaco acuosa.

- 5 Los compuestos de la presente invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de base por la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos originales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de base por tratamiento con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico.

10 Pueden formarse sales de adición de base en las que el compuesto de la invención contiene un grupo carboxi, o un bioisómero lo bastante ácido. Las bases que pueden usarse para preparar las sales de adición de base incluyen preferentemente las que producen, cuando se combinan con el ácido libre, sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales cuyos cationes son no tóxicos para el paciente en dosis farmacéuticas de las sales, de tal modo que los efectos inhibidores beneficiosos en la base libre no se ven viciados por los efectos secundarios atribuibles a los cationes. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo los obtenidos a partir de sales de metal alcalinas y alcalinotérreas, dentro del alcance de la invención incluyen los obtenidos a partir de las siguientes bases: hidruro de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de cinc, amoníaco, etilendiamina, N-metil-glucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio y similares.

20 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse de forma conveniente, o formarse durante el procedimiento de la invención, como solvatos (por ejemplo, hidratos). Los hidratos de compuestos de la presente invención pueden prepararse de forma conveniente por recristalización en una mezcla de disolventes acuosa/orgánica, usando disolventes orgánicos tal como dioxano, tetrahidrofurano o metanol.

25 Los materiales de partida y productos intermedios pueden prepararse por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo métodos tal como se describe en los Ejemplos de Referencia o sus equivalentes químicos obvios.

Los compuestos de la invención, sus métodos o preparación y su actividad biológica aparecerán con más claridad a partir del examen de los siguientes ejemplos que se presentan solo como una ilustración y no han de considerarse como que limitan la invención en su alcance.

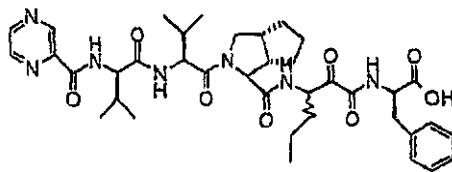
Las muestras se analizaron por TLC, RMN, RP-HPLC o EA.

- 30 Los compuestos de la invención, sus métodos o preparación y su actividad biológica aparecerán con más claridad a partir del examen de los siguientes ejemplos que se presentan solo como una ilustración y no han de considerarse como que limitan la invención en su alcance.

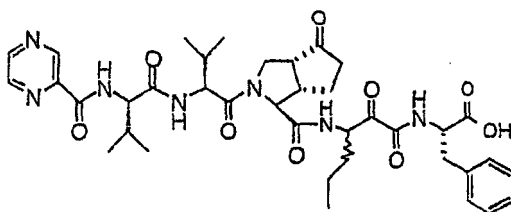
Las muestras se analizaron por TLC, RMN, RP-HPLC o EA.

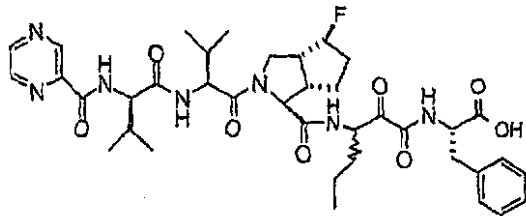
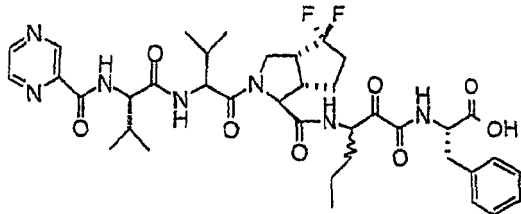
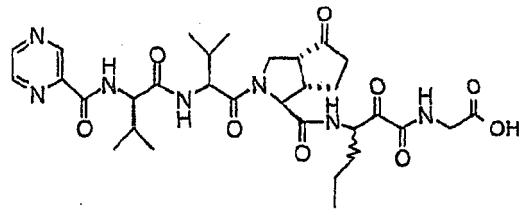
Ejemplo 1 - Compuestos de Comparación A-E:

- 35 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xi (310 mg, 0,39 mmol) se le añade TFA (4 ml). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 5 horas. En este momento, el disolvente se retira al vacío. El residuo resultante se purifica por HPLC de fase inversa, para dar 195 mg (68%) del compuesto A,



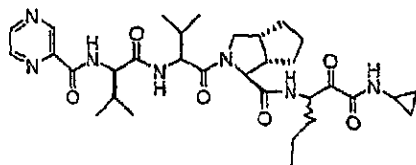
- 40 Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos B-E:



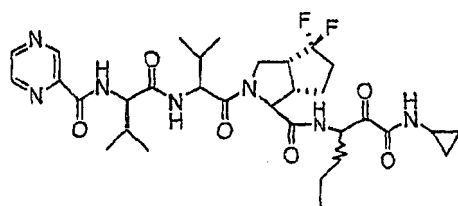
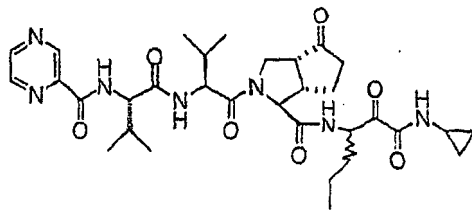


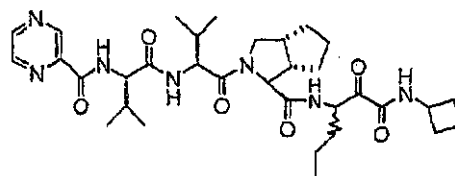
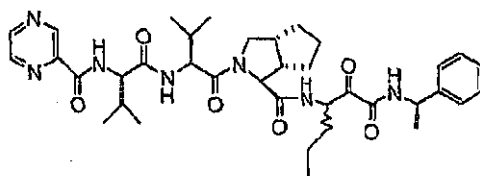
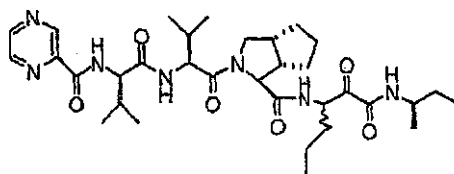
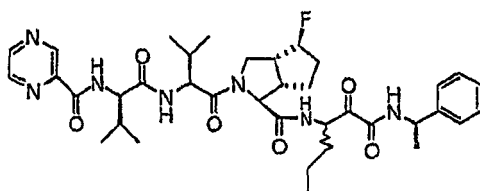
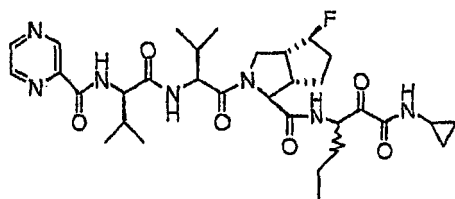
Ejemplo 2 - Compuestos de Comparación F-M:

- 5 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xii (350 mg, 0,56 mmol) se le añade el reactivo de DMP (307 mg, 0,73 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 30 minutos. Después, la mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml) y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80-90%/Hexanos), para dar 248 mg (71%) del compuesto F.



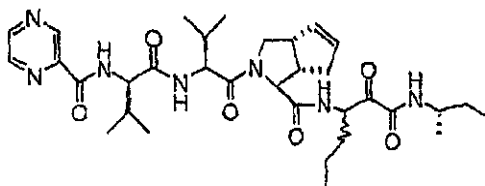
- 10 Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos G-M:





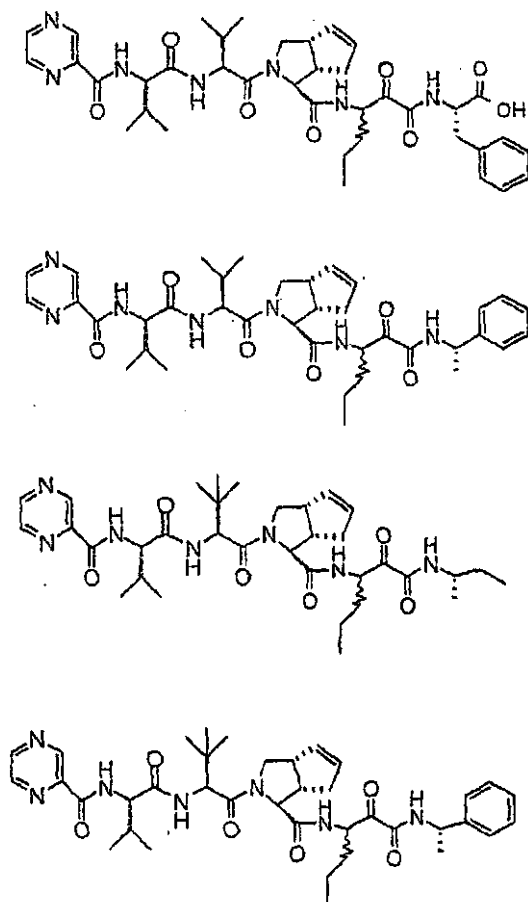
Ejemplo 3 - Compuestos de Comparación N-R:

- 5 A una solución en DCM (4 ml) del compuesto xix (~0,22 mmol) se le añade el reactivo de DMP (146 mg, 0,34 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se interrumpe con Na_2SO_3 al 10%. Después, la mezcla de reacción se diluye con DCM. La fase orgánica se separa y se lava dos veces con Na_2SO_3 al 10% y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar 78 mg (56%) del compuesto deseado N



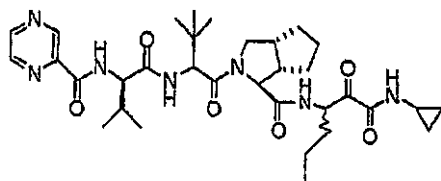
10

Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos O-R:

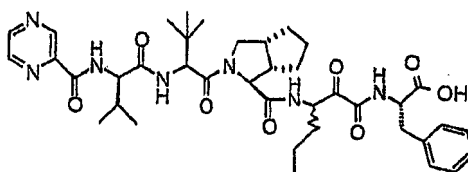


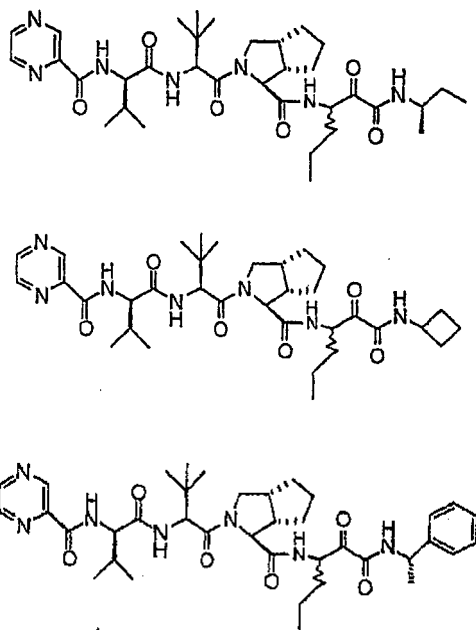
Ejemplo 4 - Compuestos de Comparación S-W:

- 5 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxv (320 mg, 0,5 mmol) se le añade el reactivo de DMP (272 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/Hexanos), para dar 170 mg (53%) del compuesto S,



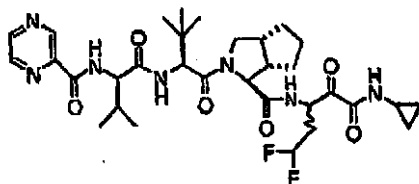
- 10 Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos T-W:





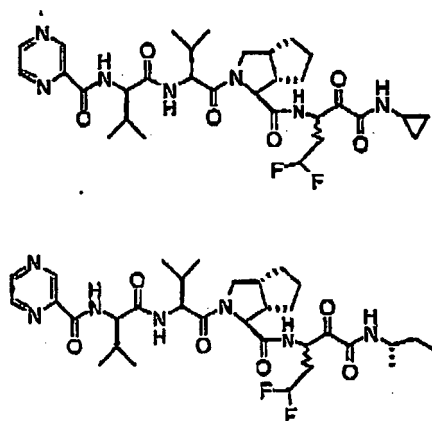
Ejemplo 5 - Compuestos de Comparación X-AD:

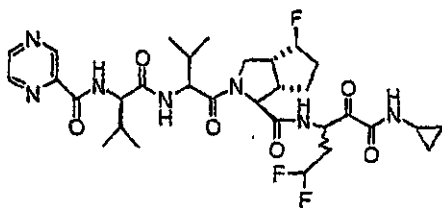
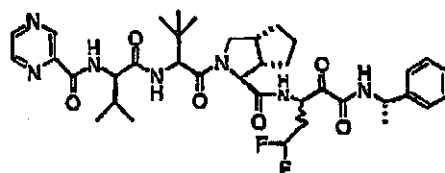
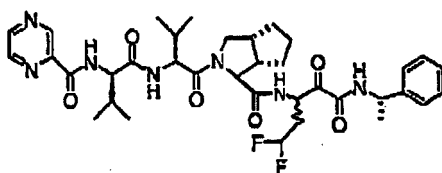
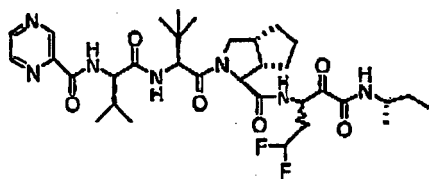
- 5 A una solución en DCM (20 ml) del compuesto xxvi (400 mg, 0,6 mmol) se le añade el reactivo de DMP (329 mg, 0,78 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1,5 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70-100%/Hexanos), para dar 210 mg (53%) del compuesto X,



10

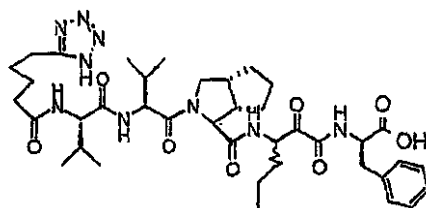
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos Y-AD:



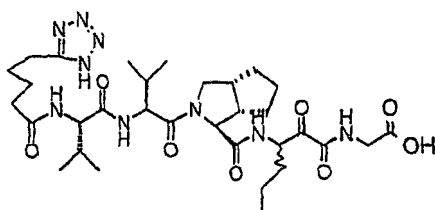


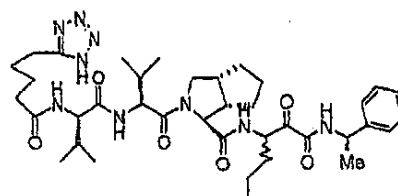
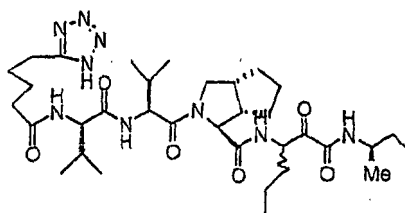
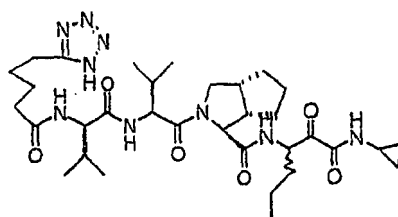
Ejemplo 6 - Compuestos de Comparación AE-AI:

- 5 El compuesto xxxiii (150 mg; 0,076 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y se agita durante dos días. El producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 40 mg (rendimiento del 33%) del compuesto AE,



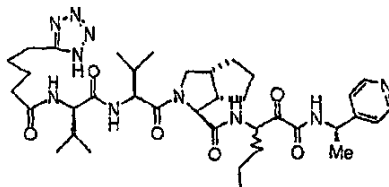
Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos AF-AI;





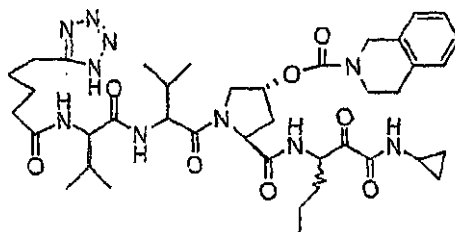
Ejemplo 7 - Compuesto de Comparación AJ:

- 5 El compuesto xxxviii (180 mg, 0,21 mmol) se disuelve en TFA puro (5 ml) y se deja durante 3 días a aproximadamente temperatura ambiente. En este momento, la mezcla de reacción se concentra al vacío, para dar un residuo, que se purifica por HPLC de fase inversa, para dar 50 mg (32%) del compuesto AJ,

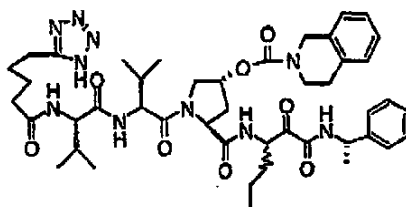
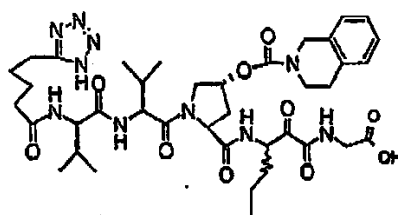


Ejemplo 8 - Compuestos AK-AM:

- 10 El compuesto xxxxiii (150 mg; 0,16 mmol) se disuelve en 4,5 ml de TFA y se agita durante tres días. El producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 70 mg (rendimiento del 54%) del compuesto AK,

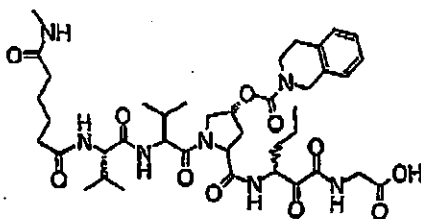


Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos AL-AM:



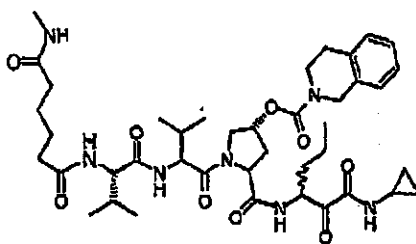
Ejemplo 9 - Compuestos AN:

- 5 El compuesto lii (80 mg) se disuelve en 3 ml de TFA y 3 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se retira por evaporación. El residuo resultante se purifica por HPLC, produciendo 62 mg (83%) del compuesto AN,



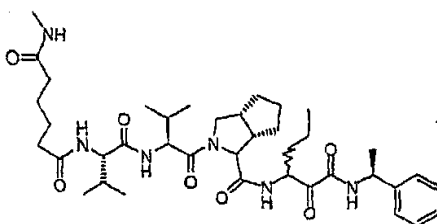
Ejemplo 10 - Compuestos AO:

- 10 El compuesto liii (160 mg; 0,2 mmol) se disuelve en 5 ml de DCM y se añade reactivo de DMP (170 mg; 0,4 mmol). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante tres horas. El disolvente se retira por evaporación y el residuo se disuelve en acetonitrilo al 50%/agua y se purifica por RP-HPLC, produciendo 51 mg (32%) del compuesto AO,



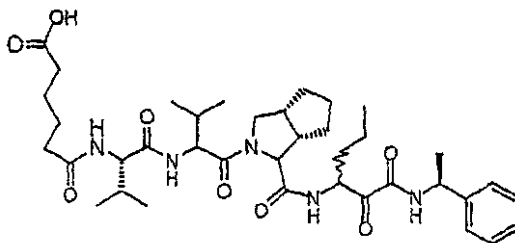
Ejemplo 11 - Compuestos de Comparación AP:

- 15 El compuesto lix (162 mg; 0,22 mmol) se disuelve en 8 ml de DCM y se añade reactivo de DMP (189 mg; 0,44 mmol). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación y el producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 41 mg (25%) del compuesto AP,



Ejemplo 12 - Compuestos de Comparación AQ:

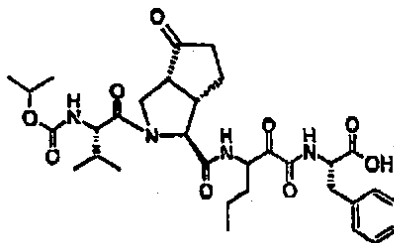
El compuesto Ix (70 mg; 0,09 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y 5 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira al vacío y el residuo se disuelve en acetonitrilo al 50%/agua y se liofiliza, produciendo el compuesto AQ en forma de un polvo,



5

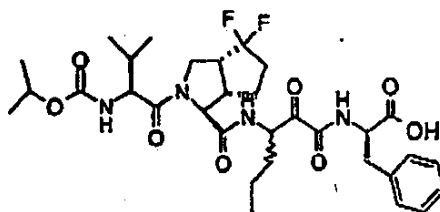
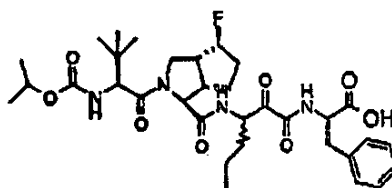
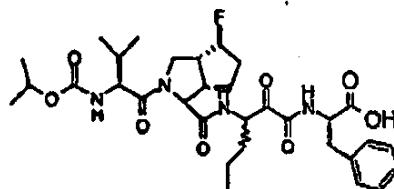
Ejemplo 13 - Compuestos de Comparación AR-BG:

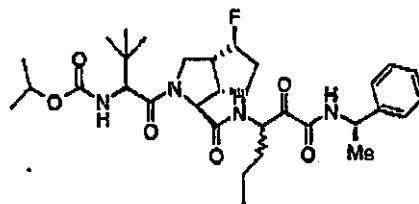
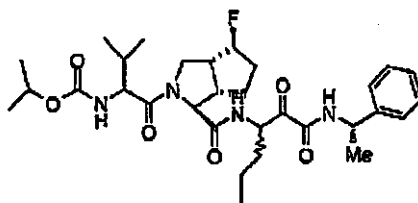
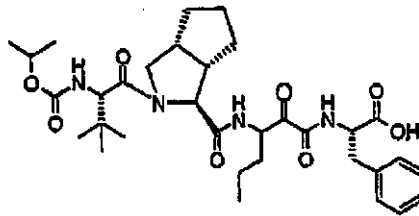
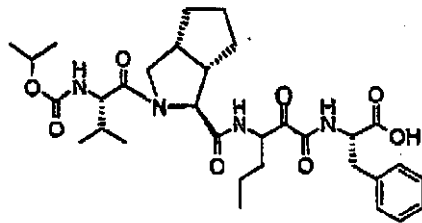
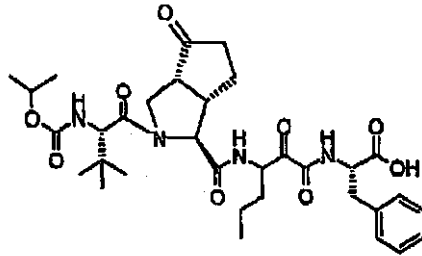
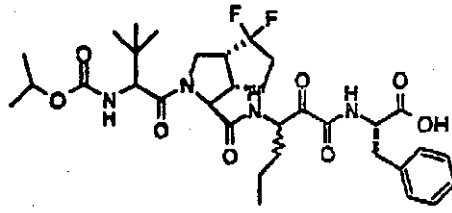
El compuesto Ixvi (223 mg, 0,326 mmol) se agita en una solución de TFA (5 ml) y DCM (5 ml) durante 4 horas. El análisis por TLC (gel de sílice: MeOH al 2%/EtOAc) mostró una conversión completa en el producto más lento. El disolvente se retira a presión reducida y el producto se liofiliza, para dar 198 mg (97%) del compuesto AR,

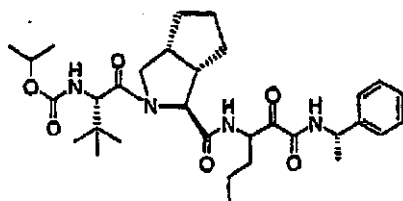
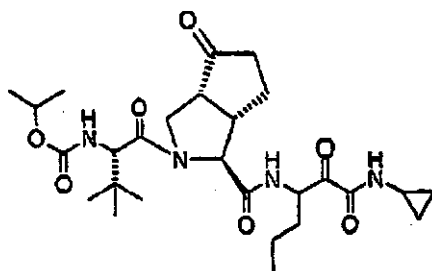
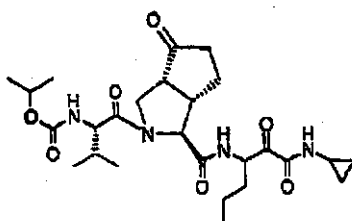
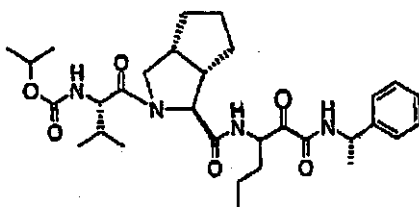
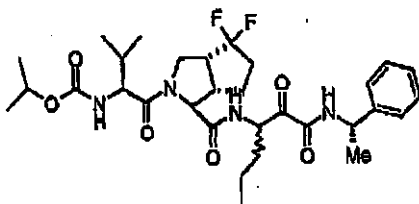
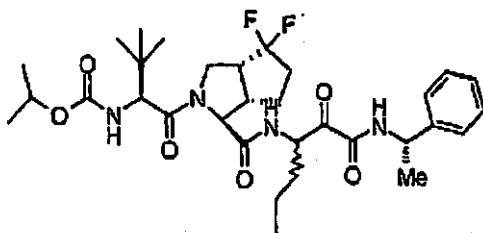


10

Siguiendo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos AS-BG:

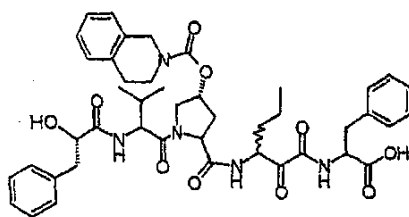




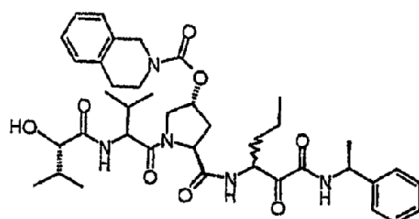
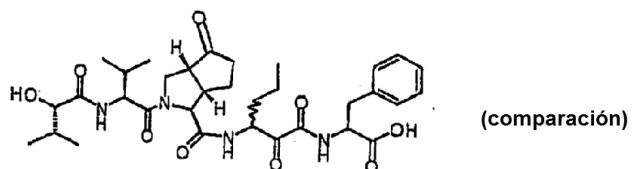
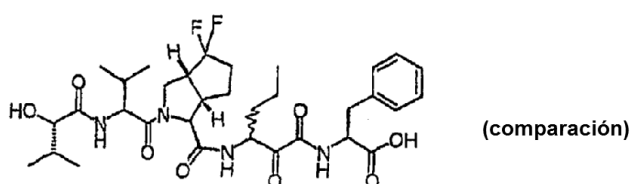
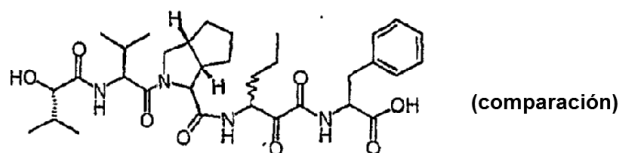
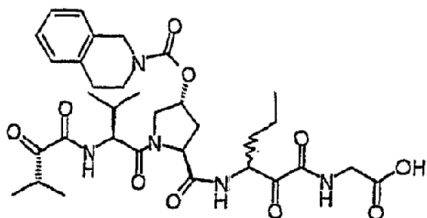
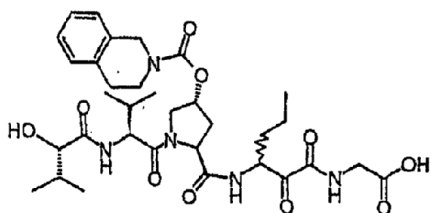


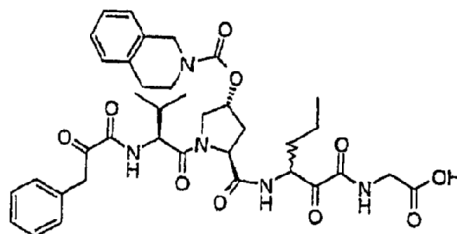
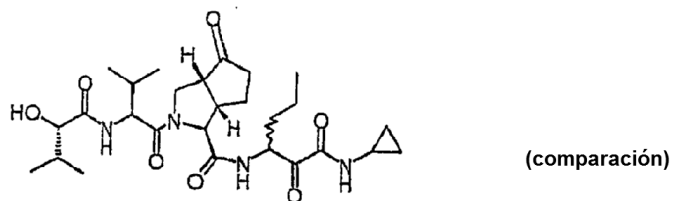
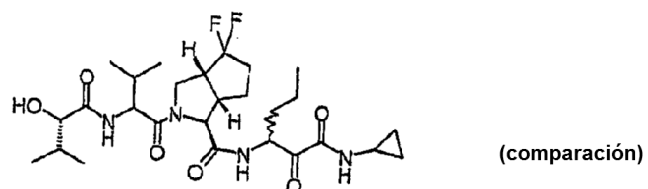
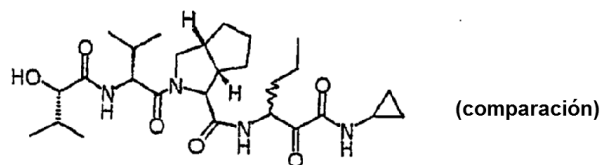
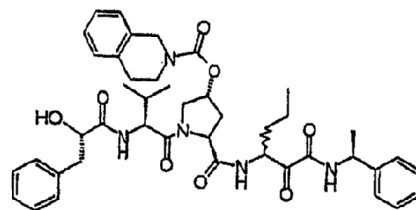
Ejemplo 14 - Compuestos BH-BS:

El compuesto Ixxiii (150 mg, 0,15 mmol) se recoge en DCM (3 ml). A esta solución se le añade TFA (1,5 ml). La solución resultante se agita durante una noche. En este momento, la reacción se concentra al vacío, para dar un residuo. El residuo se purifica por HPLC de fase inversa y se liofiliza, para dar 60 mg (50%) del compuesto BH,



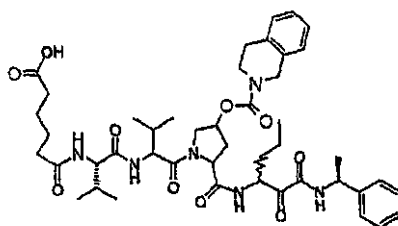
Seguindo el procedimiento anterior y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos BI-BS:

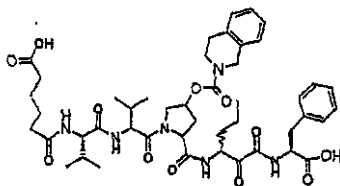




Ejemplo 15 - Compuestos BT-BU:

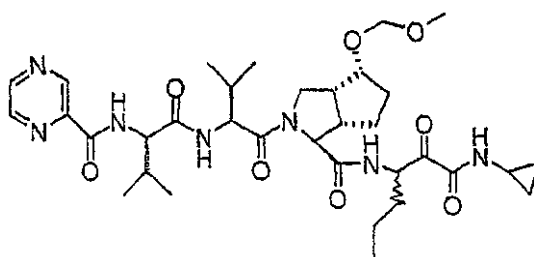
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12 y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos BT-BU:





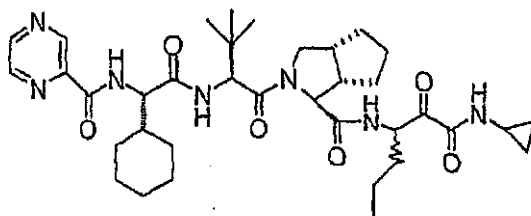
Ejemplo 16 - Compuesto de Comparación BV:

- 5 A una solución en diclorometano (4,2 ml) del compuesto lxxvii (143 mg, 0,21 mmol) se le añade el reactivo de DMP (165 mg, 0,39 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 y se concentra, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produjo 124 mg (79%) del compuesto BV,

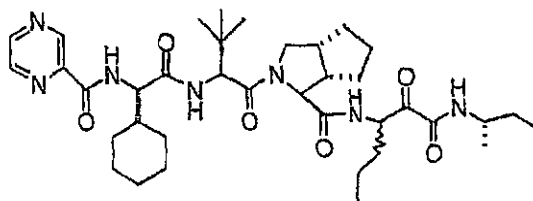


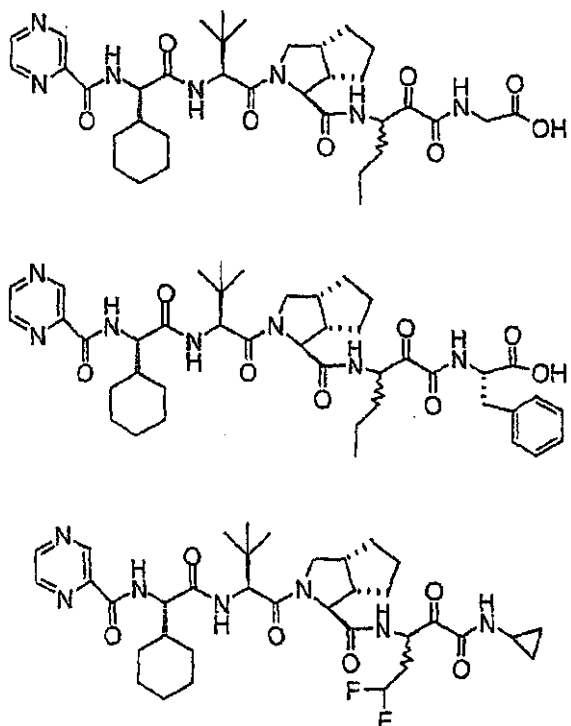
Ejemplo 17 - Compuestos de Comparación BW-CA:

- 10 A una solución en diclorometano (20 ml) del compuesto lxxxix (420 mg, 0,62 mmol) se le añade el reactivo de DMP (342 mg, 0,81 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1 hora y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/Hexanos), para dar 208 mg (50%) del compuesto BW,

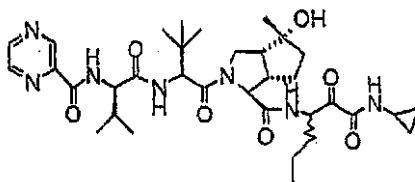


- 15 Siguiendo el procedimiento anterior pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos BX-CA:

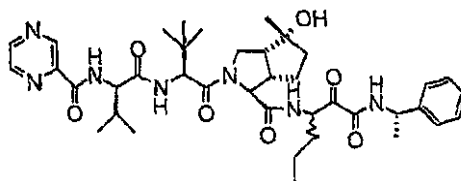


**Ejemplo 18 - Compuestos de Comparación CB-CC:**

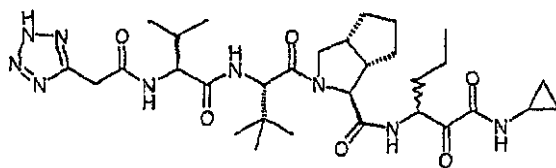
5 A una solución en diclorometano (6,5 ml) del compuesto lxxxvii (200 mg, 0,3 mmol) se le añade el reactivo de DMP (227 mg, 0,54 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con BtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 y se concentra, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 138 mg (70%) del compuesto CB,



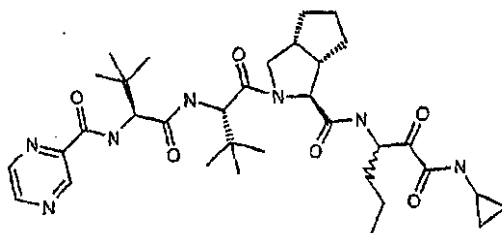
10 Siguiendo el procedimiento anterior pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CC:

**Ejemplo 19 - Compuesto de Comparación CD:**

El compuesto lxxxviii (40 mg, 0,05 mmol) se recoge en TFA (3 ml). La solución se agita durante dos noches y se concentra. El residuo se purifica por HPLC de fase inversa, para dar 25 mg (74%) del compuesto CD,

**Ejemplo 20 - Compuesto de Comparación CE:**

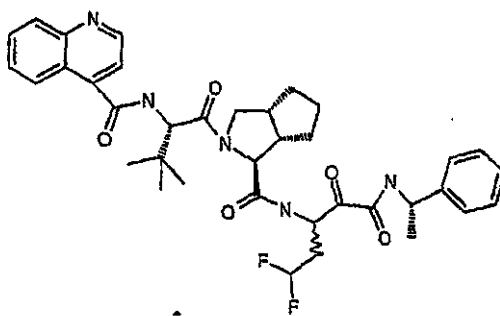
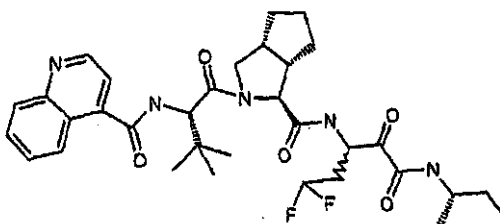
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 17 y usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CE:



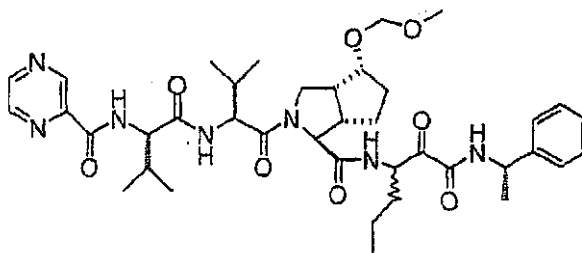
5

Ejemplo 21 - Compuestos de Comparación CF-CG:

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 14 y usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CF-CG:

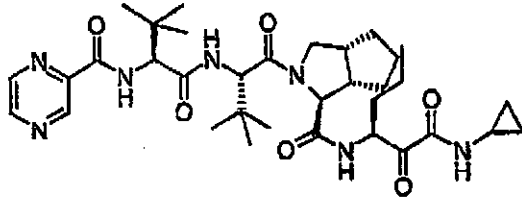
**10 Ejemplo 22 - Compuesto de Comparación CH:**

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 16 y usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CH:

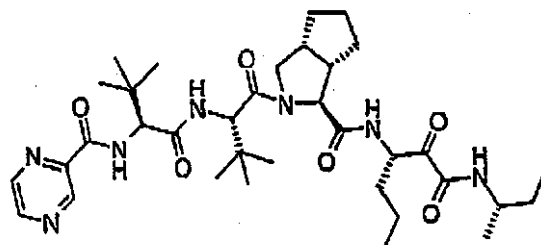
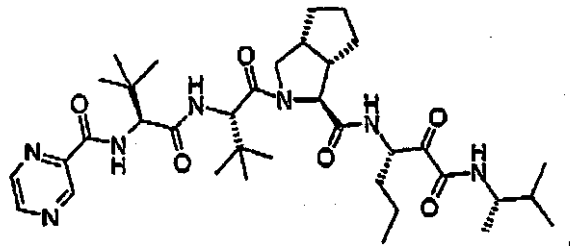
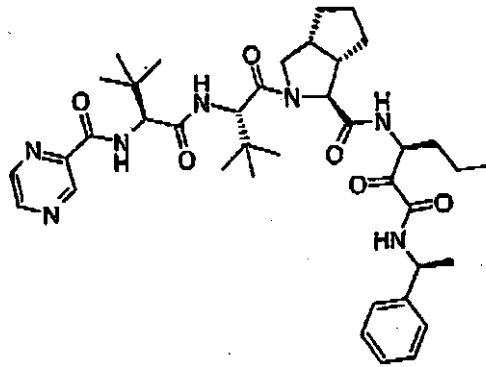


Ejemplo 23 - Compuestos de Comparación CI-CM

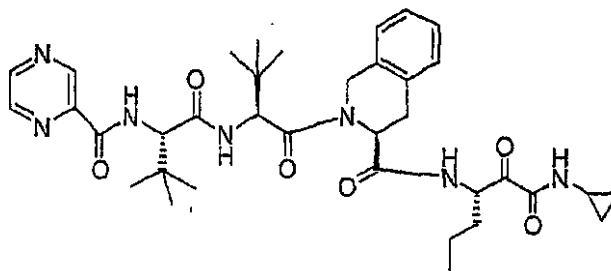
- 5 El compuesto cxi (490 mg, 0,75 mmol) se disuelve en DCM (6 ml). Se añade el reactivo de DMP (380 mg, 0,9 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con una solución en Na_2SO_3 al 10%, y después la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 70%/hexanos, produciendo el compuesto CI (325 mg, 66,4%).



- 10 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CJ-CM:

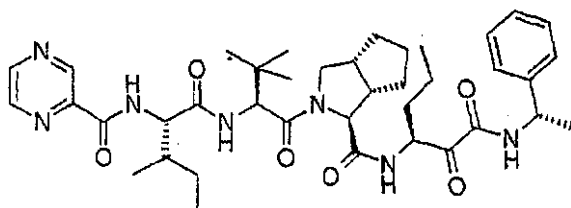


y



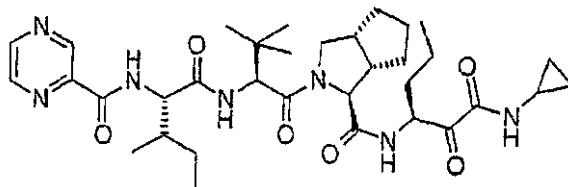
Ejemplo 24 - Compuestos de Comparación CN

- 5 A una solución en DCM/THF (3 ml/3 ml) del compuesto cxviii (335 mg, 0,46 mmol) se le añade el reactivo de DMP (300 mg, 0,69 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se inactiva con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos) produce el compuesto CN (220 mg, 67%).

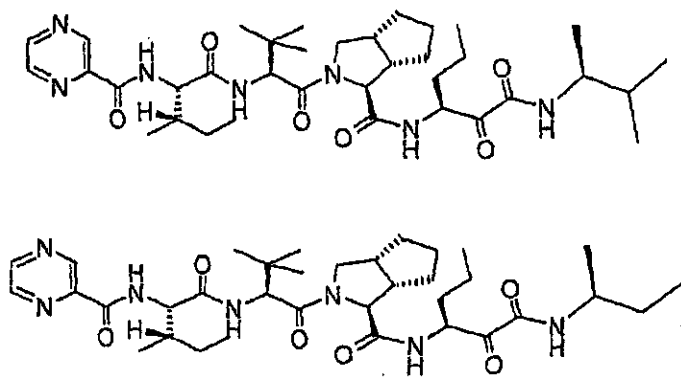


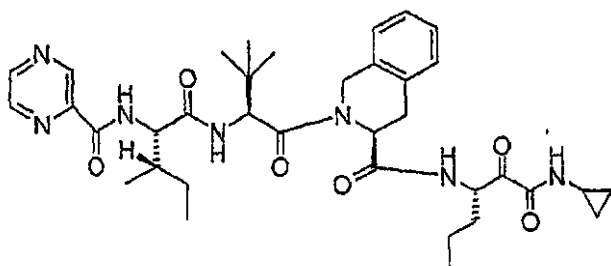
Ejemplo 25 - Compuestos de Comparación CO-CR

- 10 A una solución en DCM/THF (1,5 ml/1,5 ml) del compuesto cxix (164 mg, 0,25 mmol) se le añade el reactivo de DMP (159 mg, 0,38 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se inactiva con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos) produce el compuesto CO (100 mg, 61%).



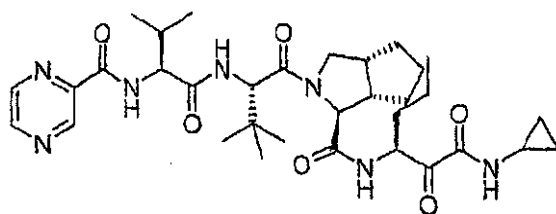
- 15 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CP-CR:



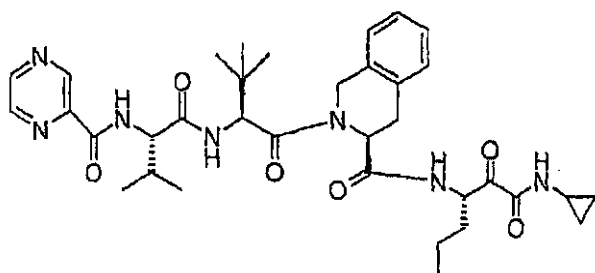


Ejemplo 26 - Compuestos de Comparación CS-CT

5 El compuesto cxx se disuelve en DCM (3 ml). A la solución se le añade el reactivo de DMP (180 mg, 0,41 mmol) y después se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na_2SO_3 al 10%, y después la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica por cromatografía con EtOAc al 100%, para producir el compuesto CS (95 mg, 43,7%).

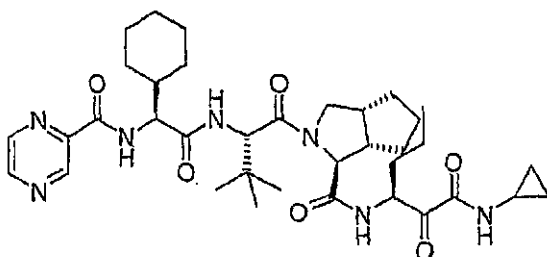


10 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto CT:



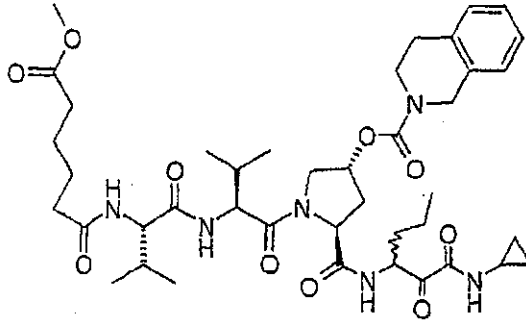
Ejemplo 27 - Compuestos CU (comparación), EI, EK-EM (comparación), EO-EZ (comparación), y FA-FG (comparación)

15 El compuesto cxxviii (356 mg, 0,52 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Se añade el reactivo de DMP (270 mg, 0,63 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na_2SO_3 al 10%, y después la fase orgánica se separa y se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. Tras la concentración del disolvente orgánico, el residuo se purifica por cromatografía con EtOAc al 100%, para producir el compuesto CU (200 mg, 56,3%). p.f. 225-235 °C.

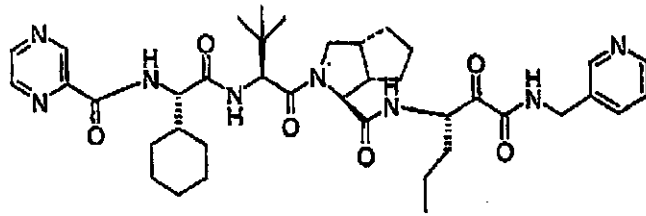


20

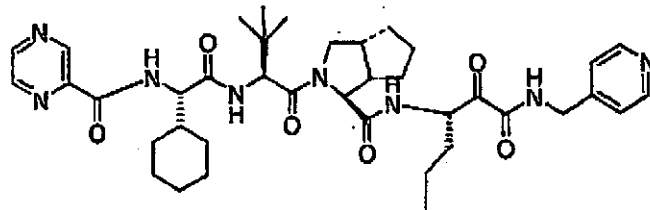
Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos EI, EK-EM, EO-EZ y FA-FH:



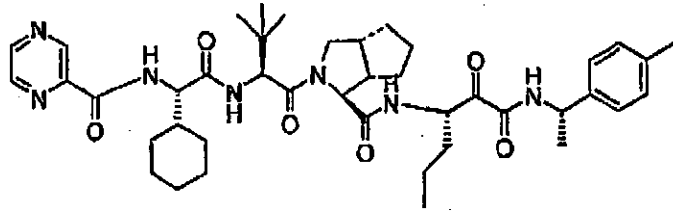
EI,



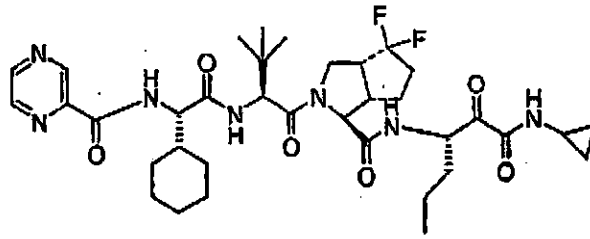
EK,



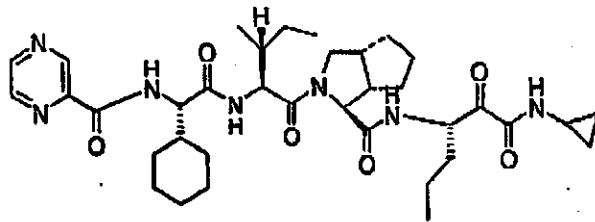
EL,



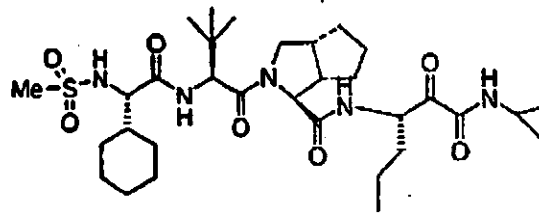
EM,



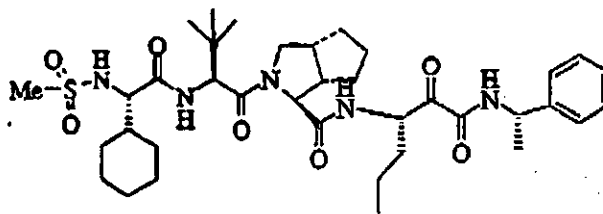
EO,



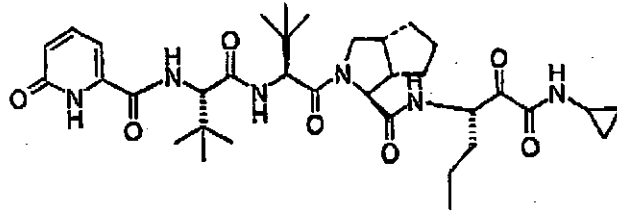
EP,



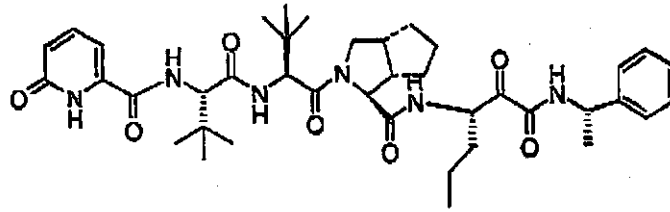
EQ,



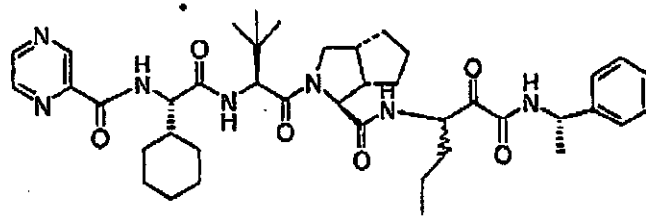
ER,



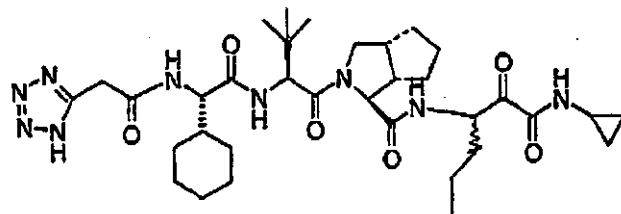
ES,



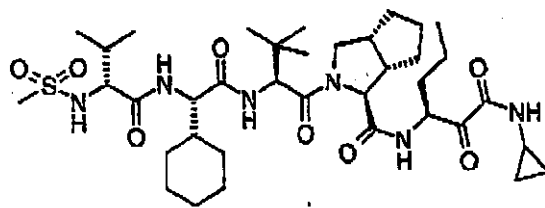
ET,



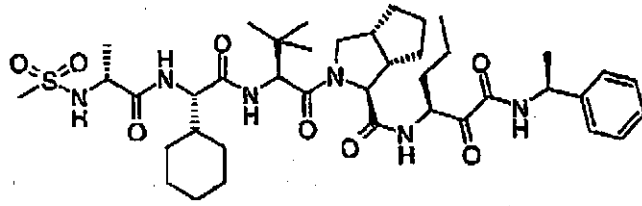
EU,



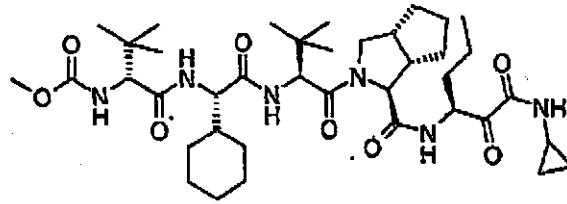
EV,



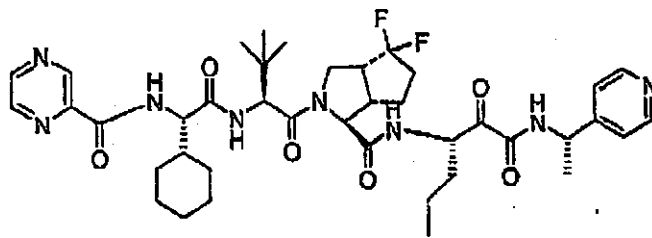
EW,



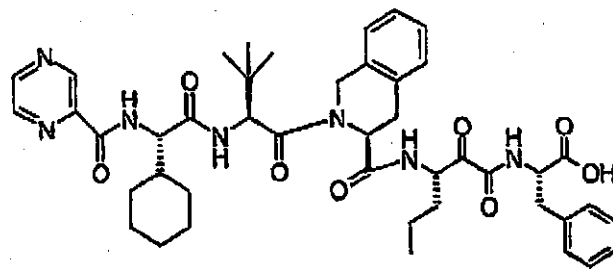
EX,



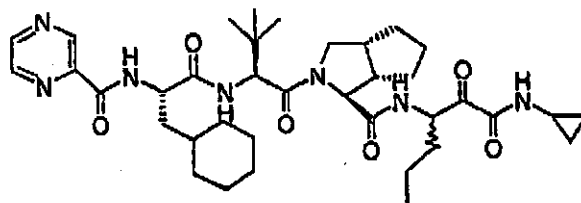
EY,



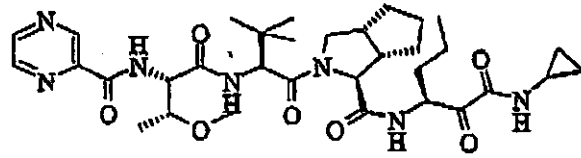
EZ,



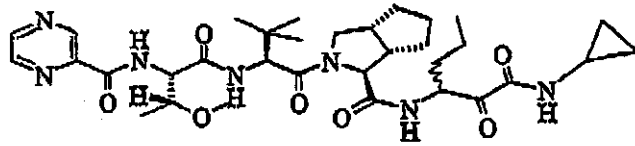
FA,



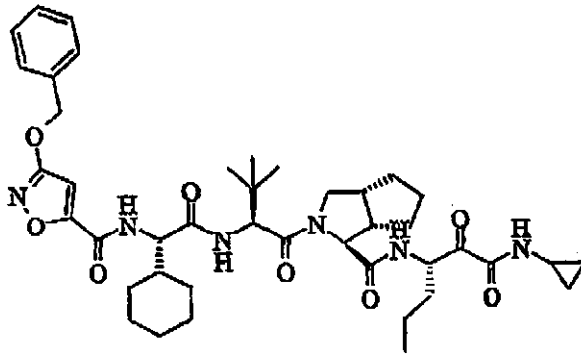
FB,



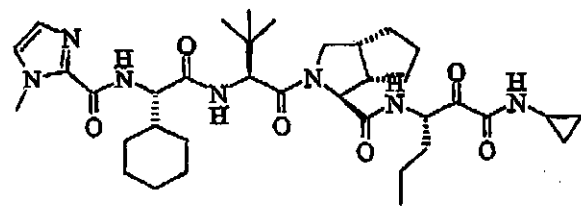
FC,



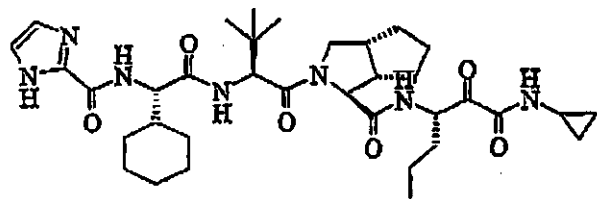
FD,



FE,

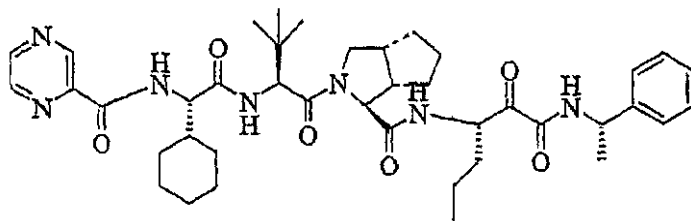


FF,



FG,

y

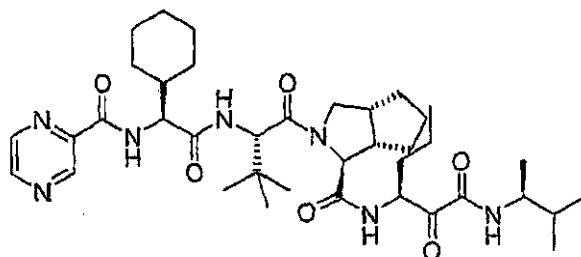


FH.

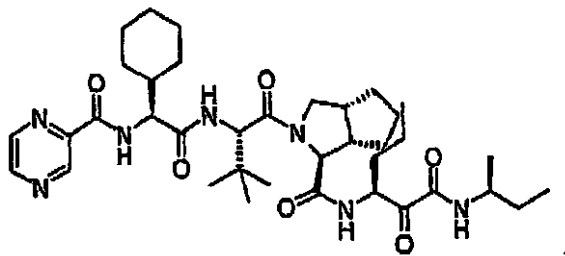
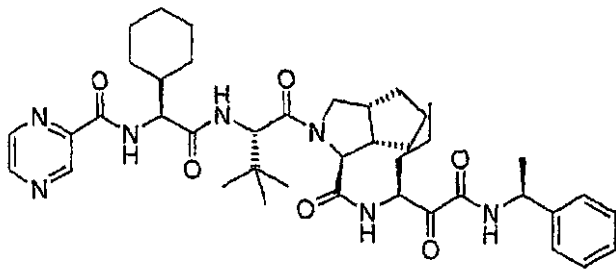
Ejemplo 28 - Compuestos de Comparación CV-DC

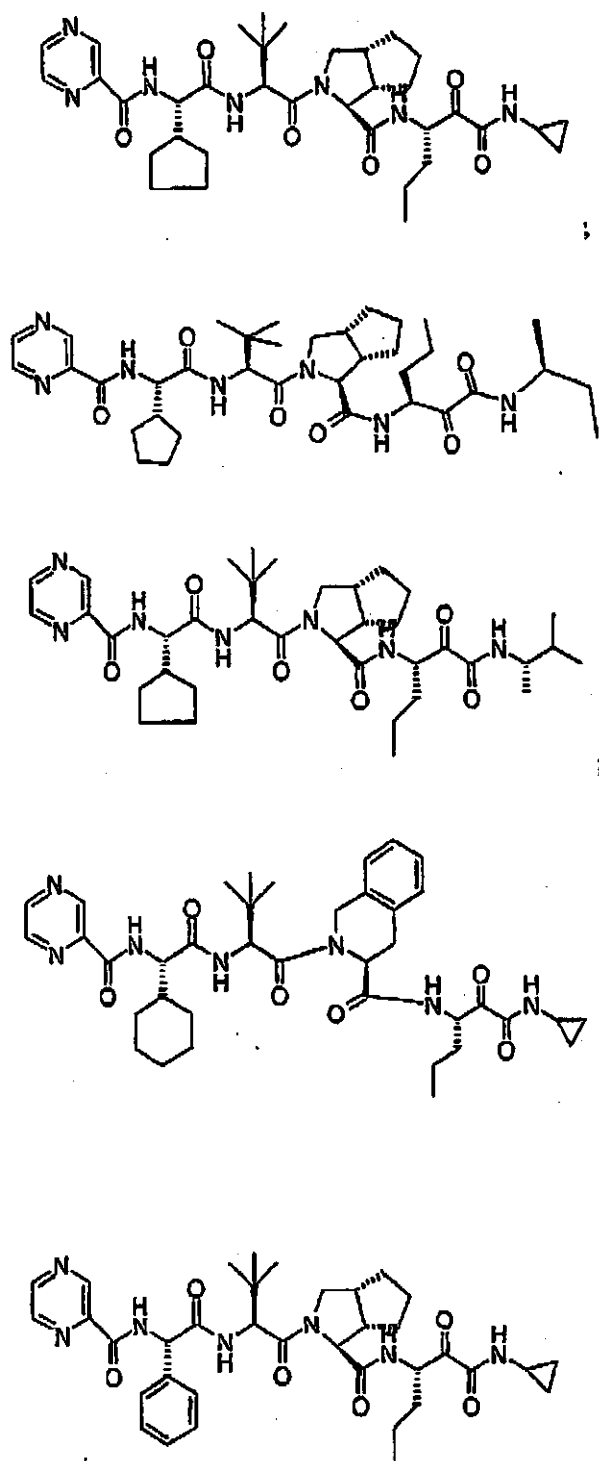
5 El compuesto cxxx (330 mg, 0,46 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Se añade el reactivo de DMP (240 mg, 0,56 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con una solución en Na_2SO_3 al 10%, y la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera.

Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 100%, para producir el compuesto cxxx (280 mg, 85,9%).



10 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos CW-DC:

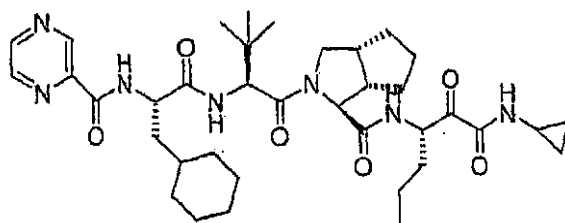




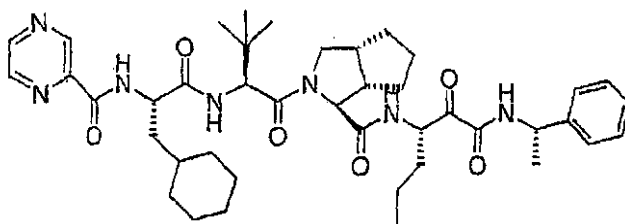
y

Ejemplo 29 - Compuestos de Comparación DD-DE

- 5 A una solución en DCM (6 ml) del compuesto cxxxviii (400 mg, 0,57 mmol) se le añade el reactivo de DMP (362 mg, 0,85 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se inactiva con Na_2SO_3 al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica extraída se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 y se concentra, produciendo aceite de color amarillo. La purificación por gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos) produce el compuesto DD (201 mg, 51%).



Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto DE:

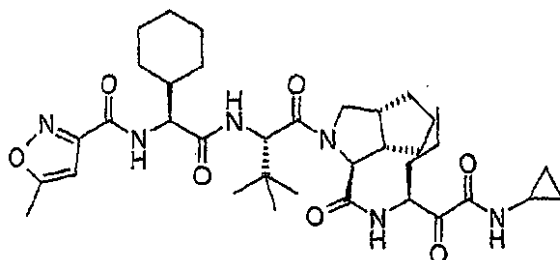


5

Ejemplo 30 - Compuesto de Comparación DF

El compuesto cxxxiii (165 mg, 0,24 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Se añade el reactivo de DMP (125 mg, 0,29 mmol) a la solución y se agita durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactiva con Na_2SO_3 al 10%, y la fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 70%/hexanos, produciendo el compuesto DF (108 mg, 65,6%).

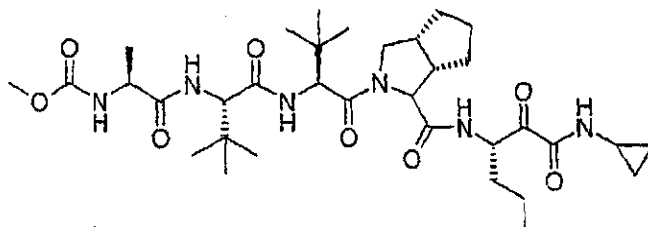
10



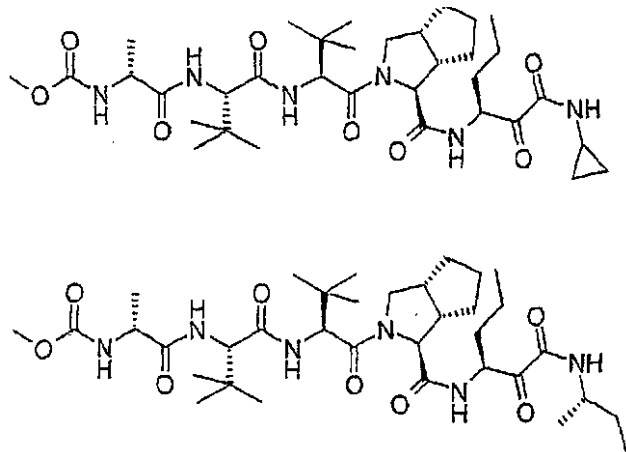
Ejemplo 31 - Compuestos de Comparación DG-DJ

A una solución del compuesto cil (0,350 g, 0,516 mmol) en DCM (15 ml) enfrida en un baño de hielo se le añade el reactivo de DMP (0,281 g, 0,671 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, después se inactiva con una solución en Na_2SO_3 al 10% y se agita durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con DCM (3 x 20 ml) y el extracto orgánico se seca (MgSO_4). Después de la filtración para retirar MgSO_4 , el filtrado se concentra y se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo al 70%/Hexanos), produciendo el compuesto final DG (0,265 g, 76%) en forma de un sólido de color blanco.

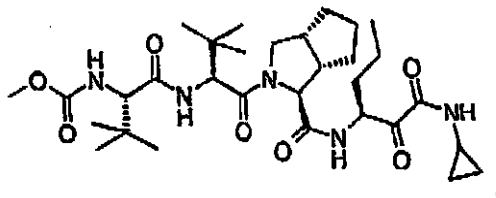
15



20 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DH-DJ:

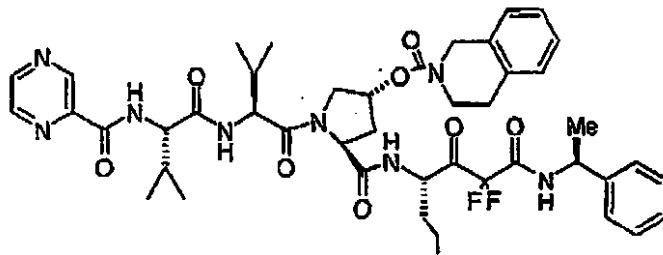


y



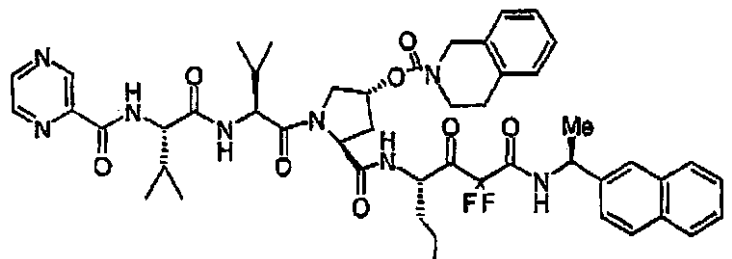
Ejemplo 32 - Compuestos DK-DN

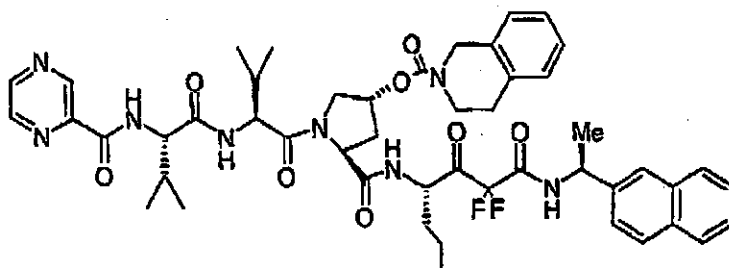
- 5 Una solución en DCM del compuesto clx (108 mg, 0,123 mmol) se trata con el reactivo de DMP (78 mg, 0,185 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc (50 ml), y se inactiva con Na₂SO₅ al 10%. Después de agitar durante 30 minutos, la fase orgánica se separa y se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos), produciendo el compuesto DK (84 mg, 78%).



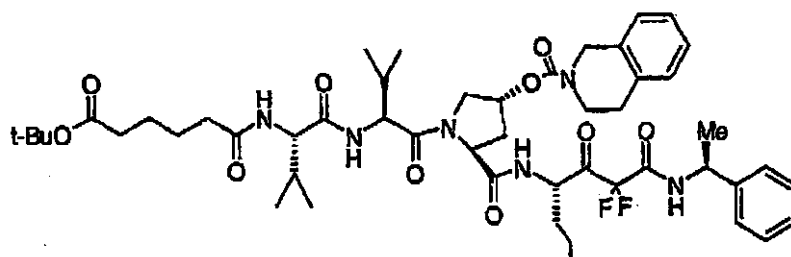
10

Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos DL-DN.

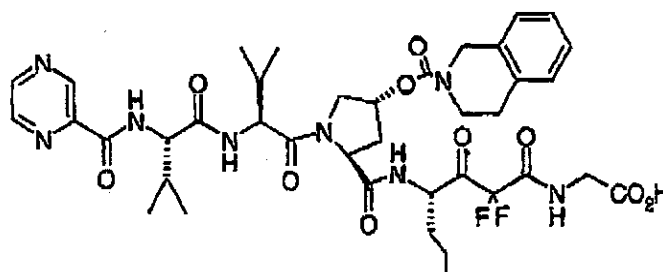




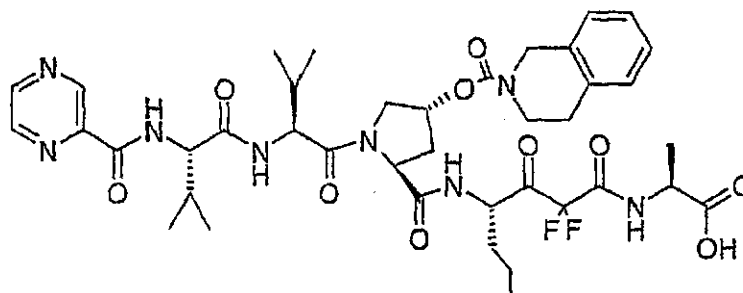
y

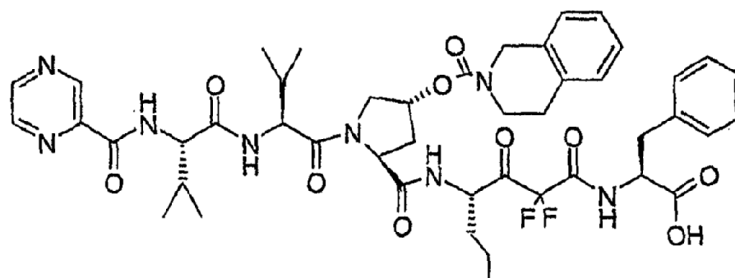
**Ejemplo 33 - Compuestos DO-DS**

- 5 Una solución en EtOH (10 ml) del compuesto clxii (174 mg, 0,189 mmol) se hidrogena usando Pd/C (equiv. al 30%, 60 mg, contenido de paladio al 10%) durante 2,5 horas. Después, el catalizador se retira por filtración. El filtrado resultante se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía semi-preparativa de fase inversa y se liofiliza, para dar el compuesto DO con un rendimiento del 70%.

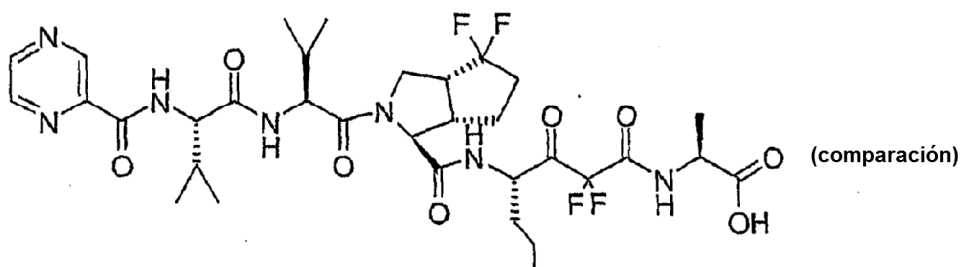


- 10 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DP-DS.

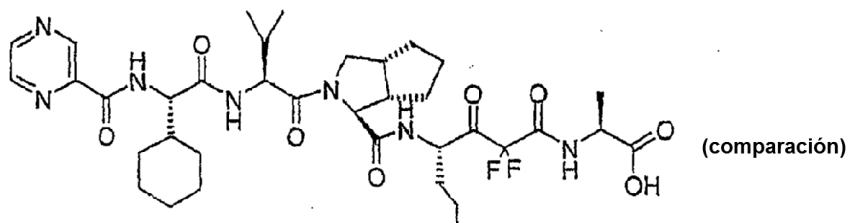




;



; y



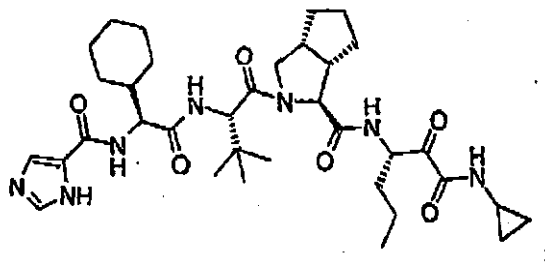
Ejemplo 34 - Compuesto de Comparación CW:

El compuesto clxiii (175 mg, 0,24 mmol) se recoge en DCM (3 ml). Se añade el reactivo de DMP (120 mg, 0,28 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% y se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. La purificación por EtOAc al 70% produce el compuesto CW (134 mg, 75%).

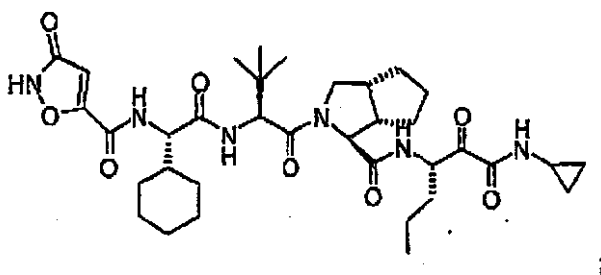
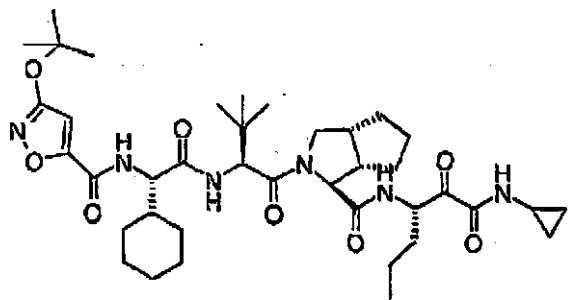
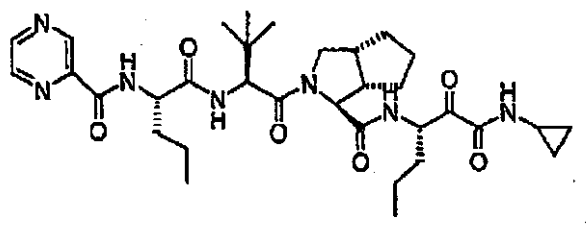
Ejemplo 35 - Compuestos de Comparación CY y DT-DX:

A una solución en DCM (15 ml) de clxxii (290 mg, 0,43 mmol) se le añade el reactivo de DMP (239 mg, 0,56 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 20 minutos. Después, la mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 8-100%/Hexanos), para dar el compuesto CY (151 mg, 52%).

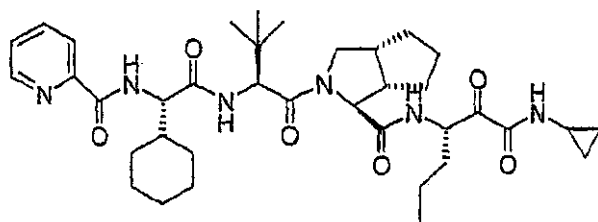
Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos consecutivos DT-DX.



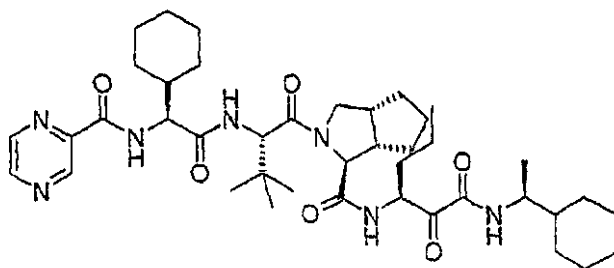
;



y

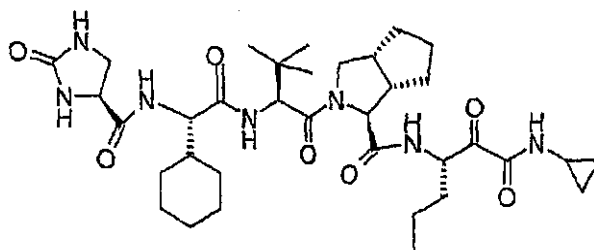
**Ejemplo 36 - Compuesto de Comparación DY:**

- 5 El compuesto lxxxv (1,17 mmol) se recoge en DCM (5 ml). Se añade el reactivo de DMP (545 mg, 1,3 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 mmol/g de resina) y se agita durante una hora. Se añade una resina eliminadora P-TBD* (2,5 mmol/g de resina) y se agita durante 45 minutos. La mezcla resultante se filtra y se purifica con EtOAc al 50%, para dar el compuesto DY (440 mg, 50,2% en dos etapas). *Referencia para la resina eliminadora P-TBD: J. Parlow y col. Tetrahedron, 55, 6785-6796 (1999).



Ejemplo 37 - Compuesto de Comparación DZ:

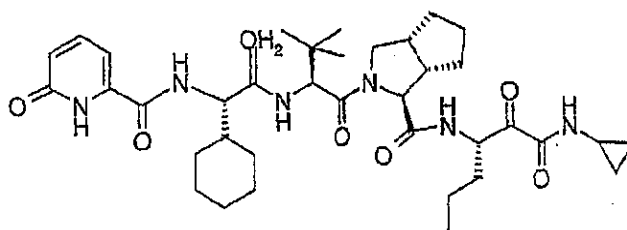
5 El compuesto material de partida clxxxix (94 mg, 0,14 mmol) se disuelve en una mezcla de THF (10 ml) y DCM (20 ml). Después, se añade el reactivo de DMP (118 mg, 0,28 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene Dri Solv THF (120 ml). La reacción se lava con Na₂SO₃ al 10% (50 ml) y después con salmuera (75 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. Después de la cromatografía (gel de sílice: elución con Dri Solv THF al 50%/EtOAc, y después con MeOH al 4%/THF). Las fracciones se comprueban por EM. Las fracciones apropiadas se liofilizan, para producir el compuesto DZ (38,8 mg, 41%).



10

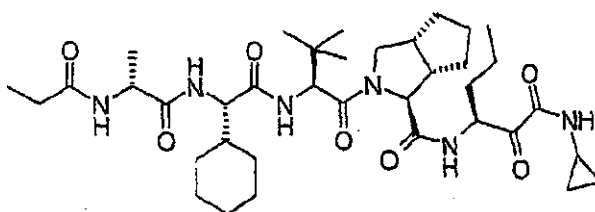
Ejemplo 38 - Compuestos de Comparación EA-EB:

15 El compuesto de partida clxxxv (185 mg, 0,26 mmol) se disuelve en THF (20 ml). Después, se añade el reactivo de DMP (219 mg, 0,52 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, el análisis por TLC muestra la conversión completa en cetona (MeOH al 5%/THF). La reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene Dri Solv THF (120 ml). La reacción se lava con Na₂SO₃ al 10% (50 ml), y después con salmuera (75 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía (gel de sílice: elución con Dri Solv THF al 50%/EtOAc, y después con MeOH al 4%/THF) y las fracciones se comprueban por UV y EM. Las fracciones apropiadas se liofilizan, para producir el compuesto EA (159 mg, 88%).



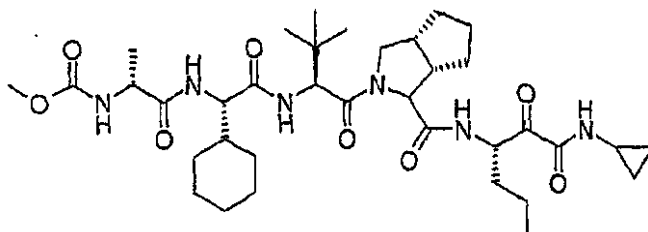
20

Si siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto EB:

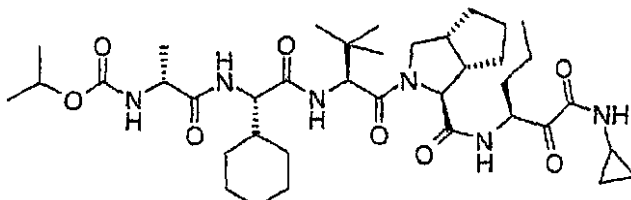


Ejemplo 39 - Compuestos de Comparación EC-ED:

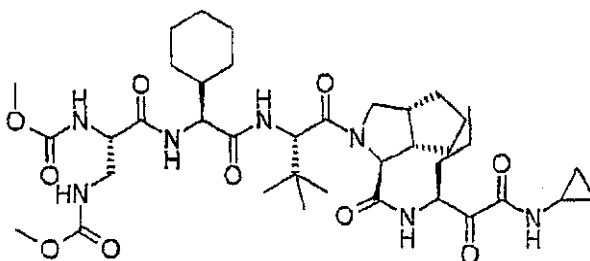
- 5 A una solución del compuesto clxxxviii (0,341 g, 0,503 mmol) en DCM (15 ml) enfiada en un baño de hielo se le añade el reactivo de DMP (0,277 g, 0,654 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, después se inactiva con una solución en Na₂SO₃ al 10% y se agita durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con DCM (3 x 20 ml) y el extracto orgánico se seca (MgSO₄). Después de la filtración para retirar MgSO₄, el filtrado se concentra y se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 70%/Hexano), para dar el compuesto BC (0,183 g, 54%) en forma de un sólido de color blanco.



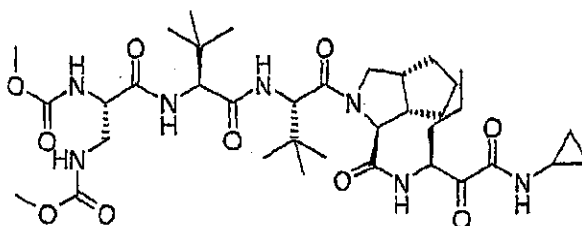
- 10 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto ED:

**Ejemplo 40 - Compuestos de Comparación EE-EG:**

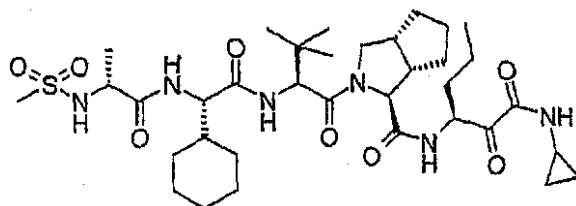
- 15 El compuesto ccii (290 mg, 0,37 mmol) se recoge en DCM (5 ml). Se añade el reactivo de DMP (175 mg, 0,41 mmol) a esta solución y se agita durante 1 hora. La reacción se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 mmol/g de resina) y se agita durante 1 hora. El reactivo de DMP inactivado se elimina con P-TBD (2,5 mmol/g de resina) y se agita durante 1 hora. La mezcla resultante se filtra, se aclara con DCM, antes de concentrarse, para dar un residuo. El residuo resultante se purifica con EtOAc al 50%/Hex, para producir el compuesto EE (440 mg, 28%).



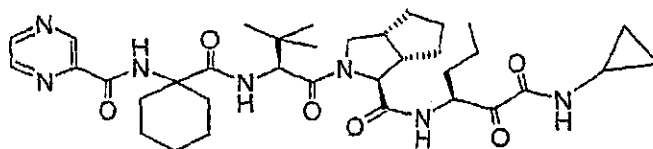
- 20 Siguiendo el procedimiento anterior para preparar el compuesto y los procedimientos anteriores relacionados con la preparación del intermedio para los mismos, pero usando los materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes compuestos EF-EG:



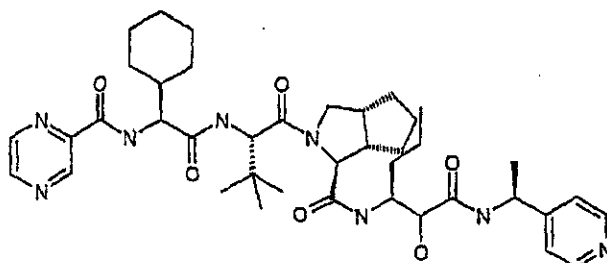
y

**Ejemplo 41 - Compuesto de Comparación EH:**

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto cciii (140 mg, 0,2 mmol) se le añade el reactivo de DMP (133 mg, 0,3 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (ac.) durante 20 minutos. La mezcla resultante se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄, se concentra, para dar un aceite de color amarillo que se purifica por gel de sílice (EtOAc al 70%/hexano), y después se liofiliza, produciendo el compuesto EH (50 mg, 38%).

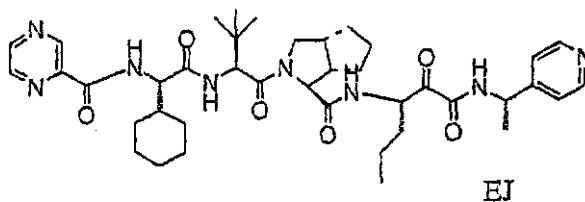
**Ejemplo 42 - Compuesto de Comparación EJ**

El compuesto ixixiii (520 mg, 1 mmol) se recoge en DCM (5 ml). Se añade PyBOP (624 mg, 1,2 mmol) a la solución anterior y se agita durante 5 minutos. El compuesto cdviii (300 mg, 1,2 mmol) en THF (5 ml) se añade gota a gota a esta solución seguido de DIPEA (0,22 ml, 1,2 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra, para dar el intermedio acoplado en bruto cdix.



cdix

Este intermedio cdix (~1 mmol) se recoge en DCM (10 ml). A esta solución se le añade Peryodinano de Dess-Martin (466 mg, 1,1 mmol). Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con un Na₂SO₃ unido a polímero (740 mg, 1,5 mmol DMP/g de resina) y se agita durante 45 minutos. Después, la mezcla de reacción se elimina con resina TBD unida a polímero (440 mg, 2,5 mmol DMP/g de resina). La mezcla resultante se agita durante 45 minutos y después se filtra. La purificación se consigue en EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto EJ (245 mg, 32% en 2 etapas). Puede encontrarse una referencia bibliográfica para el procedimiento de tratamiento en Tetrahedron 55 (1999) 6785-6796.

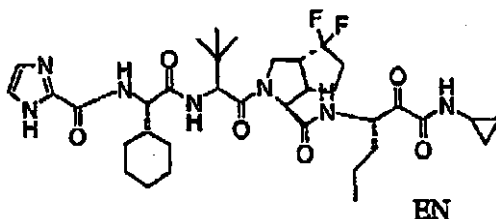


EJ

25

Ejemplo 43 - Compuesto de Comparación EN

5 El compuesto intermedio cdvii (415 mg, 0,59 mmol) se recoge en DCM (10 ml) y THF (10 ml). Se añade t-BuOH (300 ul) seguido de Peryodinano de Dess-Martin (750 mg, 1,77 mmol). La reacción se agita durante 50 minutos y después se interrumpe con P-Na₂SO₃ (1,5 mmol DMP/g de resina). Después de agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se elimina con P-TBD (2,5 mmol DMP/g de resina). Después de agitar durante 1 hora, la mezcla resultante se filtra y se concentra. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc del 50% al 70%/Hexanos), produciendo el compuesto EN (220 mg, 53%).



10 Los espectros de masas [M] se obtuvieron para los siguientes compuestos como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Observada</u>
	A	733,3
	B	747,2
	C	657,2
	D	769,4
	E	733,4
	F	625,4
	G	639,3
	H	661,4
	I	643,4
	J	707,3
	K	641,3
	L	689,3
	M	639,3
	N	639,4
	O	731,4
	P	687,4
	Q	653,4
	R	701,4
	S	639,3
	T	747,1
	U	655,4
	V	653,4
	W	703,4
	X	661,3
	Y	647,3
	Z	663,3
	AA	667,4
	AB	711,4
	AC	725,4
	AD	647,3
	AE	779,4
	AF	689,3
	AG	671,4
	AK	806,4
	AH	687,5
	AI	735,4
	AJ	736,5
	AM	870,4
	AN	813,3
	AP	724,4
	AQ	653,4
	AR	628,2

ES 2 450 815 T3

(continuación)

<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Observada</u>
	AW	642,2
	AX	614,2
	AY	628,3
	BD	570,3
	BE	520,2
	BF	534,3
	BG	584,3
	BU	890,3
	BV	685,4
	BW	679,3
	BX	695,3
	BY	697,3
	BZ	787,4
	CA	701,3
	CB	669,4
	CC	733,5
	CD	643,3
	CE	653,5
	CH	749,4
	CI	653,3
	CJ	717,5
	CK	683,4
	CL	669,3
	CM	675,2
	CN	717,2
	CO	653,3
	CP	683,3
	CQ	669,3
	CR	675,2
	CT	661,8
	CS	639,3
	CU	679,2
	CV	709,3
	CW	743,3
	CX	695,3
	CY	665,2
	CZ	681,3
	DA	695,3
	DB	701,2
	DC	673,3
	DD	693,3
	DE	757,4
	DF	682,3
	DG	676,3
	DH	676,2
	DI	692,5
	DJ	605,2
	DK	874,4
	DL	924,5
	DM	924,2
	DN	952,7
	DO	830
	DP	842,5
	DT	667,4
	DU	639,2
	DV	740,3
	DW	684,2
	DX	678,5
	DY	749,3
	DZ	685,3
	EA	649,3
	EB	700,3
	EC	702,3

(continuación)

<u>LY N°</u>	<u>Ejemplo</u>	<u>Masa Observada</u>
	ED	730,3
	EE	775,3
	EF	749,3
	EG	722,3
	EH	665,2
	EI	796,4
	EJ	744,3
	EK	730,5
	EL	730,5
	EM	757,3
	EN	703,5
	EO	715,5
	EP	679,2
	EQ	651,3
	ER	715,3
	ES	668,5
	ET	732,5
	EU	743,3
	EV	683,3
	EW	750,4
	EX	786,4
	EY	744,5
	EZ	780,4
	FB	693,4
	FC	655,3
	FD	655,3
	FE	774,4
	FF	681,5
	FG	667,5

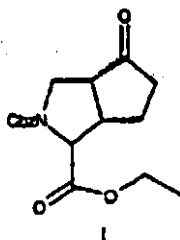
Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) de los siguientes compuestos se obtuvieron como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

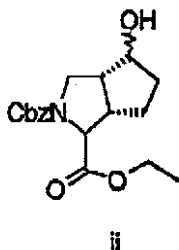
Ejemplo	Fórmula Molecular (M+1)	EM Calculado (M+1)	Masa Observada (M+1)
L	C37H52N7O6	690,3979	690,3986
M	C33H50N7O6	640,3822	640,3822
Z	C32H48F2N7O6	664,3634	664,3627
AB	C36H48F2N7O6	712,3634	712,3649
CE	C34H52N7O6	654,3979	654,3967
EN	C35H52N7O6F2	704,3947	704,3945
EK	C37H63N6O8S	751,4428	750,4350 (M)
BC	C36H59N6O8	703,4395	703,4382
CA	C35H50N7O6F2	702,3790	702,3801
EZ	C40H55N8O6F2	781,4213	781,4196
EU	C36H52N7O6F2	716,3947	716,3929
CY	C35H52N7O6	666,3979	666,3966
BX	C37H58N7O6	696,4448	696,4432
S	C33H50N7O6	640,3823	640,3831
BW	C36H54N7O6	680,4136	680,4126
CU	C36H54N7O6	680,4136	680,4128
EJ	C40H57N8O6	745,4401	745,4417
EM	C33H54N7O6	668,4136	668,4139
Ninguno	C41H58N7O6	744,4448	744,4691

Ejemplo Intermedio 1 - Compuesto ii

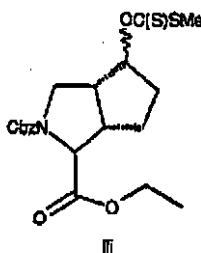
A una solución en etanol (40 ml) del compuesto i (8,1 g, 24,4 mmol) se le añade NaBH_4



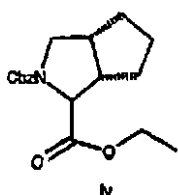
- 5 (924 mg, 24,4 mmol) a $-10\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se agita a esta temperatura durante 30 minutos, y después se interrumpe con AcOH (3 ml). La mezcla de reacción se diluye con EtOAc (250 ml) y se lava con NaHCO_3 y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/Hexanos), para dar 7,85 g (97%) del compuesto ii,

**Ejemplo Intermedio 2 - Compuesto iii**

- 10 A una solución en THF (70 ml) del compuesto ii (4,48 g, 13,4 mmol) se le añade a $0\text{ }^\circ\text{C}$ NaH (699 mg, 60%, 17,42 mmol). Después de agitar a esa temperatura durante 40 minutos, se añade MeI puro (1,25 ml, 20,1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se interrumpe cuidadosamente con una solución saturada de NH_4Cl a $0\text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla de reacción se extrae con Et_2O y EtOAc. La fase orgánica se lava con agua y salmuera y se seca con Na_2SO_4 . La fase orgánica obtenida de esta
15 manera se concentra al vacío, para dar el compuesto xantano iii.

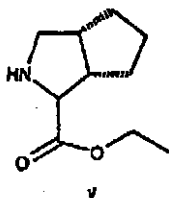
**Ejemplo Intermedio 3 - Compuesto iv**

- 20 El compuesto xantano iii (~13,4 mmol) se disuelve en tolueno (100 ml). A esta solución se le añade AIBN (216 mg, 1,34 mmol). La solución resultante se desgasifica con nitrógeno seco y después se trata con $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$ (5,4 ml, 20,1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a $90\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas. En este momento, la reacción se enfría a temperatura ambiente y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 15-20%/Hexanos), para dar 2,8 g (66% total del compuesto ii) del compuesto iv.

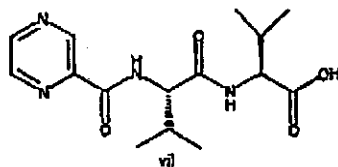


Ejemplo Intermedio 4 - Compuesto v

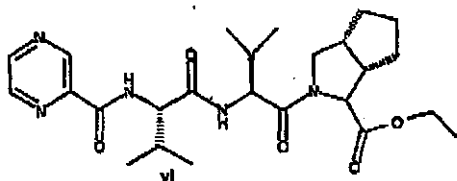
5 A una solución en etanol (21 ml) del compuesto iv (1 g, 3,15 mmol) se le añade Pd(OH)₂/C (655 mg, 20%, 0,95 mmol) en una corriente de nitrógeno. La mezcla de reacción resultante se somete a hidrogenación convencional (1,5 atm). Después de 5 horas, la fuente de hidrógeno se retira y la reacción se filtra. Los filtrados se concentran al vacío, para dar el compuesto de amina libre v.

**Ejemplo Intermedio 5 - Compuesto vi**

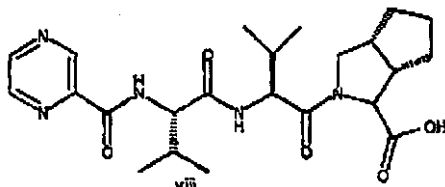
A una solución en DCM (10 ml) del compuesto vii (629 mg, 1,95 mmol) se le añade a aproximadamente



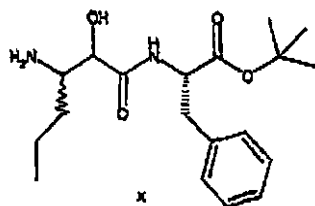
10 temperatura ambiente HOAt (265 mg, 1,95 mmol) y seguido de una solución 1 M de DCC en DCM (1,95 ml, 1,95 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, se añade una solución en DCM (3 ml) del compuesto v (1,5 mmol) al ácido activado con HOAt anterior. La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se diluyen con EtOAc (75 ml) y se lavan con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por
15 cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70-80%/Hexanos), para dar 620 mg (85%) del compuesto vi.

**Ejemplo Intermedio 6 - Compuesto viii**

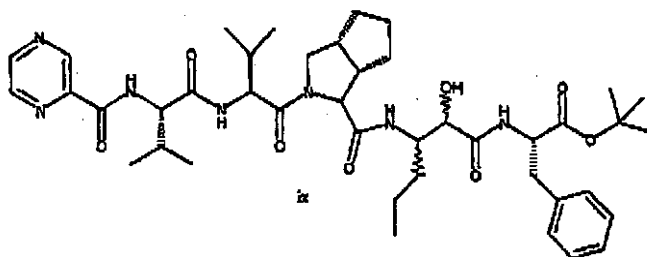
20 A una solución en etanol (10 ml) del compuesto vi (615 mg, 1,26 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (1,26 ml, 2,52 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 usando resinas ácidas Dowex. Los sólidos se retiran por filtración y los filtrados se concentran al vacío, para dar un residuo que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH₃CN/H₂O. Esta solución se somete a liofilización, para dar 495 mg (85%) del compuesto viii.

**Ejemplo Intermedio 7 - Compuesto ix**

25 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto viii (230 mg, 0,5 mmol) se le añade PyBop (417 mg, 0,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (5,25 ml) del compuesto x (263 mg, 0,75 mmol) seguido de

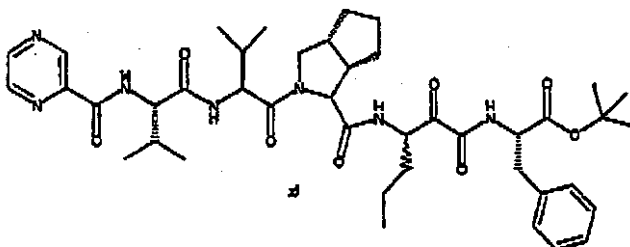


- 5 DIPEA (0,174 ml, 1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (30 ml) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar ~400 mg (100%) del compuesto ix,



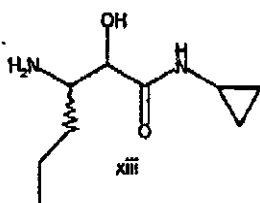
Ejemplo Intermedio 8 - Compuesto xi

- 10 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto ix (396 mg, 0,5 mmol) se le añade el reactivo de DMP (278 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 1 hora y después se interrumpe con Na_2SO_3 al 10% durante 30 minutos. Después, la mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml) y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/Hexanos), para dar 320 mg (81%) del compuesto xi,

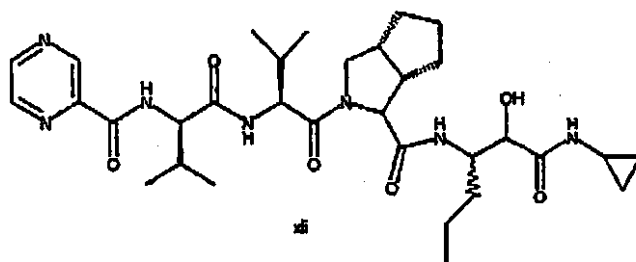


Ejemplo Intermedio 9 - Compuesto xii

- 15 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto viii (230 mg, 0,5 mmol) se le añade PyBop (417 mg, 0,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (3,5 ml) del compuesto xiii (140 mg, 0,75 mmol)

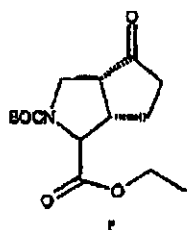


- 20 seguida de DIPEA (0,174 ml, 1 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (30 ml) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml). La fase orgánica se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar el compuesto xii con rendimiento cuantitativo.



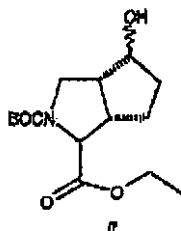
Ejemplo Intermedio 10 - Compuesto i'

5 A una solución en metanol (30 ml) del compuesto i' (5 g, 15,1 mmol) se le añaden (BOC)₂O (3,3 g, 15,1 mmol) y H₂/Pd(OH)₂/C (1,6 g, contenido de Pd al 10%). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtra dos veces a través de Celite. El lecho de Celite se aclara con DCM. Los filtrados combinados se concentran al vacío, produciendo un residuo oleoso que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos), para dar 3,8 g (85%) del compuesto i',



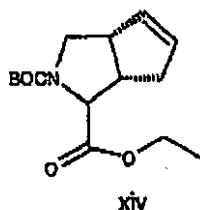
Ejemplo Intermedio 11 - Compuesto ii'

10 A una solución en metanol (111 ml) del compuesto i' (3,7 g, 12,5 mmol) se le añade a 0 °C NaBH₄ (0,805 g, 21 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 2,5 horas, el disolvente de reacción se evapora lentamente al vacío, produciendo un residuo que se diluye con EtOAc. Después, esta solución se lava dos veces con agua. La fase acuosa se extrae con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secan con MgSO₄, se filtran y se concentran al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía, para dar 3,76 g (99%) del compuesto ii'.



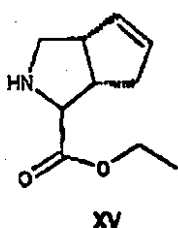
15 **Ejemplo Intermedio 12 - Compuesto xiv**

20 A una solución en DCM (180 ml) del compuesto ii' (3,76 g, 12,3 mmol) se le añade a 0 °C DMAP (5 g, 40,1 mmol) y después seguido de Tf₂O (4 ml, 23,7 mmol). La reacción se agita a 0 °C durante 1 hora y a aproximadamente temperatura ambiente durante 1,5 horas más. Después, la mezcla de reacción se lava dos veces con NaHCO₃ al 5% y se seca con MgSO₄. La fase orgánica obtenida de esta manera se concentra al vacío, para dar el triflato en bruto. El triflato resultante (2,7 g, 6 mmol) se disuelve en DCM (120 ml). A esta solución se le añade DMAP (2,5 g, 20,5 mmol). La mezcla de reacción resultante se calienta a reflujo durante una noche. En este momento, la reacción se enfría a temperatura ambiente y se lava dos veces con NaHCO₃ al 5%. La mezcla de reacción se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra al vacío, produciendo un residuo oleoso de color parduzco que se purifica (MeOH al 1%/DCM), para dar 500 mg (30%) del compuesto xiv,



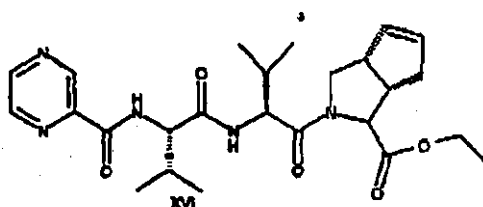
Ejemplo Intermedio 13 - Compuesto xv

El compuesto xiv (500 mg, 1,8 mmol) se disuelve en HCl 4 N en dioxano (6,75 ml). Después, la reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante ~4 horas. En este momento, el disolvente se retira al vacío. El residuo resultante se valora con éter dietílico dos veces, para dar la sal HCl del compuesto xv en rendimiento casi cuantitativo.



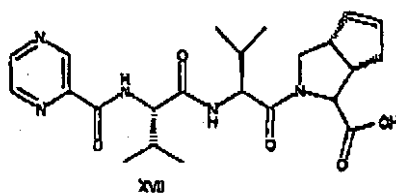
Ejemplo Intermedio 14 - Compuesto xvi

A una solución en THF (7 ml) del compuesto vii (579 mg, 1,8 mmol) se le añaden HOAt (245 mg, 1,8 mmol) y DCC (1,8 ml, 1 M en DCM). Se produce como resultado una suspensión. Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 15 minutos, a la suspensión anterior se le añade una solución en THF (6 ml) del compuesto xv (1,8 mmol) y DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmol). Después se añade más cantidad de DIPEA (0,8 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente. En ese momento, los sólidos de color blanco formados de esta manera se retiran por filtración. Los sólidos de color blanco se aclaran con THF. Los filtrados y los lavados combinados se concentran al vacío, para dar el producto en bruto que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (100 °C EtOAc), para dar 665 mg (76%) del compuesto xvi,



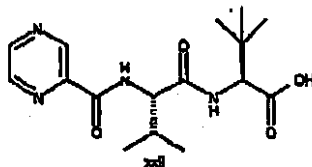
Ejemplo Intermedio 15 - Compuesto xvii

A una solución en etanol (8 ml) de 7 (665 mg, 1,37 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (2,4 ml) a 0 °C. La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente, y después se acidifica a pH 3 usando resinas ácidas Dowex. Los sólidos se filtran. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, para dar un residuo amarillo pálido que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH₃CN/H₂O y se liofiliza, para dar 467 mg (74%) del compuesto xvii,

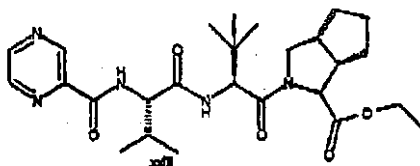


Ejemplo Intermedio 19 - Compuesto xxii

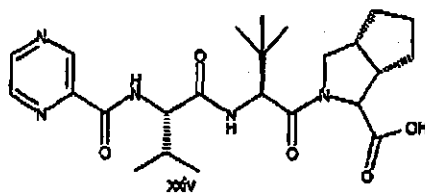
- 5 A una solución en metanol (40 ml) del compuesto xxi (4,67 g, 13,34 mmol) se le añade NaOH 2 N (10 ml, 20 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas. En este momento, a la mezcla de reacción se le añade una cantidad adicional de NaOH 2 N (3,3 ml, 6,67 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, la reacción se acidifica a pH 3 usando resina ácida. Después, la reacción se filtra y los filtrados se concentran al vacío, produciendo un residuo que se disuelve en 1:1 de CH₃CN/H₂O para la liofilización. Se obtienen 4,15 g (93%) del compuesto xxii.

**Ejemplo Intermedio 20 - Compuesto xxiii**

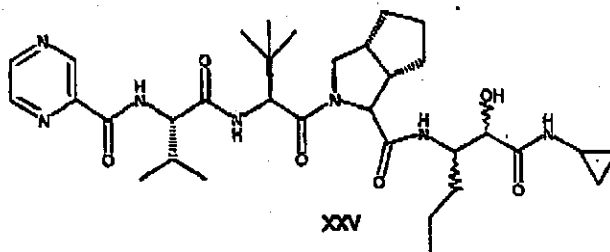
- 10 Una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxii (917 mg, 2,73 mmol) se trata con HOAt (371 mg, 2,73 mmol) y DCC (273 mg, 1 M, 2,73 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto v (500 mg, 2,73 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, los sólidos de color blanco (urea) se filtran. Los filtrados se concentran al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 60-70%/Hexanos), para dar 1,06 g (77%) del compuesto xxiii,

**Ejemplo Intermedio 21 - Compuesto xxiv**

- 20 Una solución en etanol (20 ml) del compuesto xxiii (1,06 g, 2,11 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,11 ml, 4,23 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con resina ácida. Los sólidos se retiran por filtración. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, para dar un residuo que se liofiliza, para dar ~1 g (100%) del compuesto xxiv,

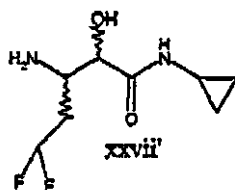
**Ejemplo Intermedio 22 - Compuesto xxv**

- 25 Una solución en DCM (10 ml) del compuesto xxiv (236,7 mg, 0,5 mmol) se trata con PyBop (417 mg, 0,8 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en DMF (5,6 ml) del compuesto xiii (139,5 mg, 0,75 mmol) seguido de DIPEA (0,174 ml, 1 m ml). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 8 horas, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar ~320 mg (100%) del compuesto xxv,
- 30

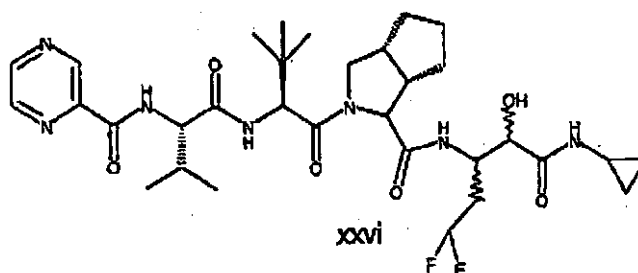


Ejemplo Intermedio 23 - Compuesto xxvi

Una solución en DCM (15 ml) del compuesto xxiv (355 mg, 0,75 mmol) se trata con PyBop (622 mg, 1,2 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto xxvii' (156 mg, 0,75



mmol) seguido de DIPEA (0,26 ml, 1,5 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 2%/EtOAc), para dar ~400 mg (80%) del compuesto xxvi,



Ejemplo Intermedio 24 - 5-cianopentanoato de metilo

Se disuelve cianuro potásico (4 g, 61,44 mmol) en 70 ml de agua y 200 ml de metanol. A la solución se le añaden 10 g (51,2 mmol) de 5-bromopentanoato de metilo y la mezcla se calienta a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se concentra a sequedad. Al residuo se le añaden 100 ml de EtOAc para extraer el producto. La fase orgánica se lava tres veces con agua, se seca y se concentra, produciendo 5,37 g (74%) de 5-cianopentanoato de metilo en forma de un aceite.

Ejemplo Intermedio 25 - 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo

Se disuelve 5-cianopentanoato de metilo (4,8 g, 34 mmol) en tolueno, y se añaden cloruro de trietilamonio (14 g, 102 mmol) y azida sódica (6,63, 102 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se añade agua para extraer (3 x 100 ml) 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo de la fase orgánica. A la fase acuosa se le añade HCl concentrado para ajustar el pH a 2. El producto se extrae de la solución acuosa con EtOAc (3 x 50 ml). La fase orgánica se combina, se seca y se concentra, produciendo 4,25 g (68%) de 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo.

Ejemplo Intermedio 26 - 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo

Se disuelven 5-tetrazol-5-ilpentanoato de metilo (4,23 g, 23 mmol) y ácido tricloroacético (8,69 g, 53 mmol) en 50 ml de CHCl_3 . A la solución se le añade gota a gota α -metilestireno (2,72, 23 mmol), y la mezcla de reacción se deja en agitación a aproximadamente la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc , para dar 200 ml, y la fase orgánica se lava con KOH acuoso al 10% y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida, produciendo 6,6 g (95%) 5-[N-(1,1-

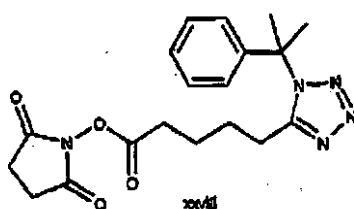
dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo.

Ejemplo Intermedio 27 - ácido 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico

Se disuelve 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoato de metilo (6,6 g, 21,8 mmol) en metanol (100 ml) y se añaden 23 ml de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agita durante una noche y se concentra para retirar el metanol. El residuo se disuelve en agua (100 ml) y la solución se neutraliza añadiendo el mismo equivalente de HCl acuoso 1 N. El producto se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). El producto orgánico se seca y se concentra, produciendo 4,75 g (75%) de ácido 5-[N-(1,1- dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico.

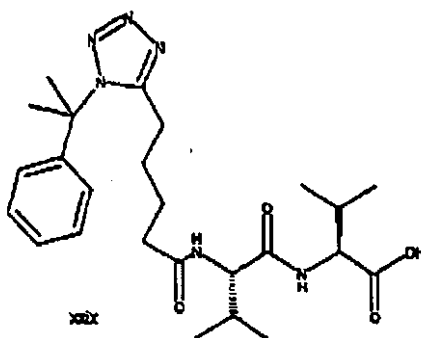
Ejemplo Intermedio 28 - Compuesto xxviii

Se disuelve ácido 5-[N-(1,1-dimetilbencil)tetrazol-5-il]pentanoico (4,75 g, 16,5 mmol) en DCM (100 ml), se añaden 4,8 g (24,8 mmol) de EDCI y 6 ml de DIPEA. A la mezcla se le añade N-hidroxilsuccinimida (3,8 g, 33 mmol). La mezcla de reacción se agita durante tres horas aproximadamente a la temperatura ambiente. La mezcla se diluye con DCM, para dar 200 ml y la solución se lava tres veces con agua. El producto orgánico se seca y se concentra, produciendo 4,79 g (75%) del compuesto xxviii,



15 Ejemplo Intermedio 29 - Compuesto xxix.

El dipéptido H-Val-Val-OH (3,22 g, 14,9 mmol) se suspende en 50 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) y se añaden 4,75 g (12,42 mmol) del compuesto xxviii tras la adición de 3,4 ml (18,63 mmol) de diisopropiletilamina (DIPEA). La mezcla se calienta hasta 40 °C y se agita durante una noche. El disolvente se evapora a alto vacío. El residuo se disuelve en EtOAc y se lava con HCl 1 N y salmuera, produciendo 5,52 g (91%) del compuesto xxix,

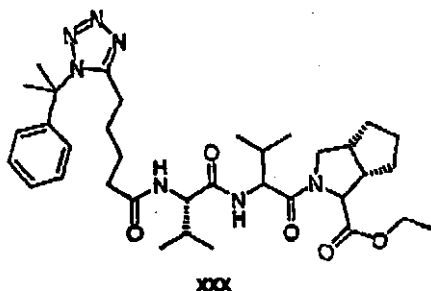


20

Ejemplo Intermedio 30 - Compuesto xxx

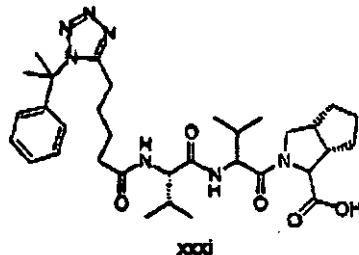
Se disuelven 1,6 g (3,29 mmol) del compuesto xxix en 20 ml de DCM y se añaden 3,3 ml de una solución 1 M de DCC en THF. A la mezcla se le añaden 500 mg (2,73 mmol) del compuesto v. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluye con EtOAc, para dar 100 ml y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera. Se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano), produciendo 1,02 g (58%) del compuesto xxx,

25



Ejemplo Intermedio 31 - Compuesto xxxi

El compuesto xxx (1,02 g, 1,57 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agita durante una noche. El metanol se retira por evaporación y el residuo se disuelve en agua y se neutraliza con 2 ml de HCl. Tras la extracción con EtOAc, se proporciona 1,00 g (~100%) del compuesto xxxi.

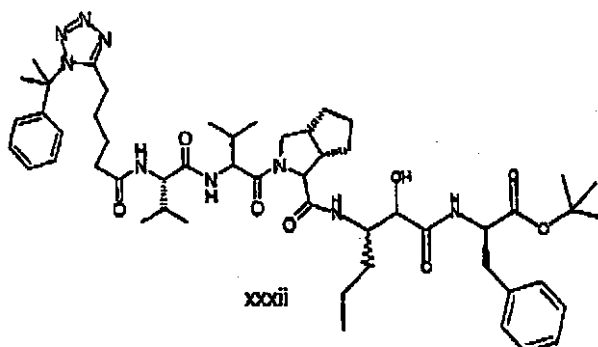


5

Ejemplo Intermedio 32 - Compuesto xxxii

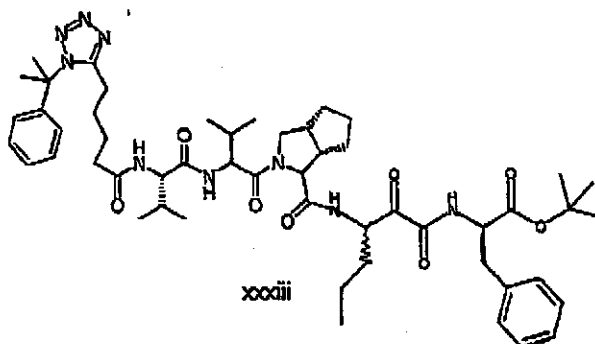
El compuesto xxxi (300 mg, 0,48 mmol) y PyBop (300 mg, 0,58 mmol) se disuelven en 10 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto x (201 mg, 0,58 mmol) y después se le añade DIPEA (104 μ l). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, para dar 100 ml, y se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ y tres veces con salmuera. El producto orgánico se seca y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 100%), produciendo 450 mg (98%) del compuesto xxxii,

10

**Ejemplo Intermedio 33 - Compuesto xxxiii**

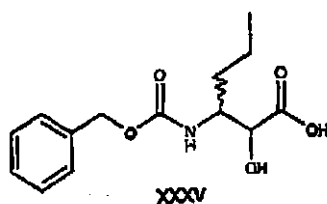
El compuesto xxxii 360 mg (0,38 mmol) se disuelve en 8 ml de DCM y se añaden 240 mg (0,57 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla se diluye con EtOAc, para dar 50 ml, y se lava tres veces con salmuera. El producto se purifica por cromatografía en columna (etanol al 25%/EtOAc), produciendo 300 mg (83%) del compuesto xxxiii,

15

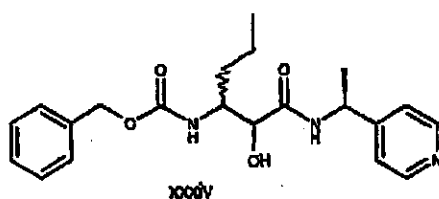
**Ejemplo Intermedio 34 - Compuesto xxxiv**

A una solución en DCM (10 ml) de xxxv (790 mg, 2,80 mmol) se le añade PyBop (1,7 g,

20



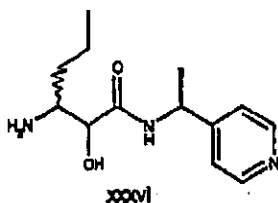
336 mmol) y Hobbit (450 mg, 336 mmol). La solución resultante se enfría a 0 °C y se trata con una solución en DCM (3 ml) de (s)- α -(4-piridil)etilamina (410 mg, 336 mmol). Esto se sigue de la adición de DIPEA (0,5 ml, 3,36 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente. En este momento, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc. El conjunto se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar 630 mg (58%) del compuesto xxxiv,



Nota: Se obtiene (s)- α -(4-piridil)etilamina a partir de su sal D-tartrato por lavado con una base (NaOH 1 N) y la extracción de posterior de EtOAc. La tasa de recuperación es del 89%.

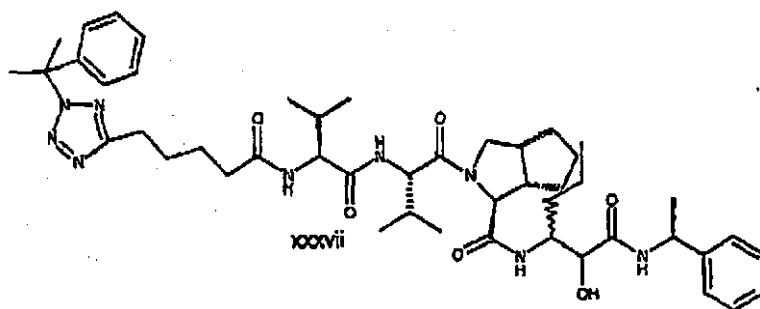
Ejemplo Intermedio 35 - Compuesto xxxvi

A una solución en metanol (15 ml) del compuesto xxxiv (630 mg, 1,64 mmol) se le añade en una atmósfera de N₂ Pd/C (150 mg, contenido de paladio al 10%). La reacción se agita en una atmósfera de H₂ durante una noche. La mezcla de reacción se filtra a través de una capa de Celite® 521. Los filtrados se concentran al vacío, para dar 420 mg (~100%) del compuesto xxxvi,



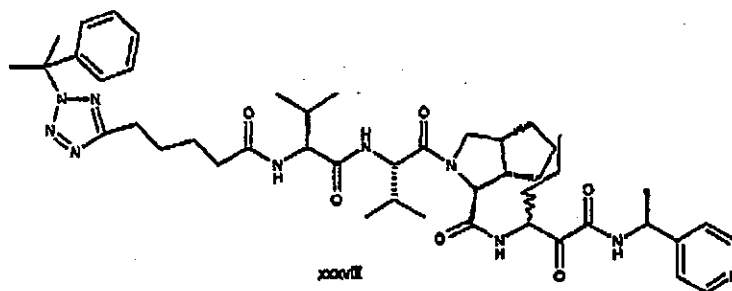
Ejemplo Intermedio 36 - Compuesto xxxvii

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto xxxi (270 mg, 0,43 mmol) se le añade PyBop (270 mg, 0,52 mmol). Esto se sigue de la adición del compuesto xxxvi (160 mg, 0,64 mmol) y DIPEA (0,09 ml, 0,52 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc y se lava con HCl 0,1 N seguido de NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra, para dar el compuesto xxxvii (430 mg de masa total) para la siguiente etapa

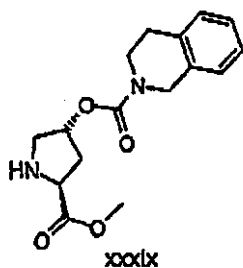


Ejemplo Intermedio 37 - Compuesto xxxviii

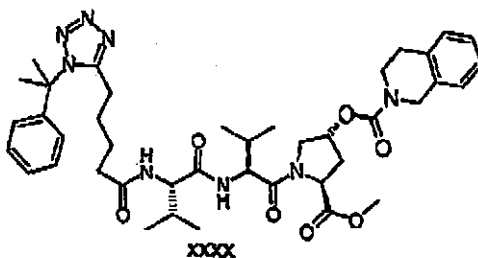
- 5 A una solución en DCM (3 ml) del compuesto xxxvii (370 mg, 0,43 mmol) se le añade el reactivo de DMP (280 mg, 0,65 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se interrumpe con Na_2SO_3 al 10%. Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), para dar 180 mg (49% en 2 etapas) del compuesto xxxviii.

**Ejemplo Intermedio 38 - Compuesto xxxx**

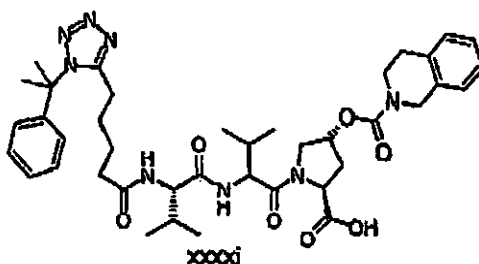
- 10 El compuesto xxix (2,5 g, 5 mmol) se disuelve en 40 ml de DCM, y a la solución se le añaden 5,1 ml de una solución 1 M de DCC en THF. A la mezcla se le añaden 1,08 g (3,53 mmol) del compuesto xxxix. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche.



- 15 La mezcla se diluye con EtOAc, para dar 100 ml, se lava secuencialmente con HCl 1 N, NaHCO_3 y salmuera, y después se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 80%/hexano), produciendo 2,59 g (95%) del compuesto xxxx,

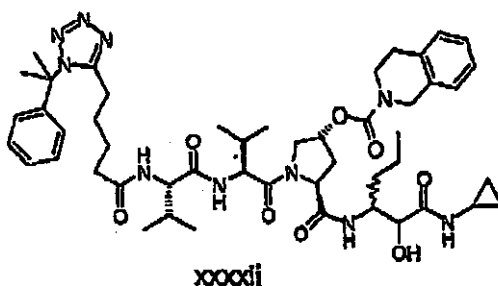
**Ejemplo Intermedio 39 - Compuesto xxxxi**

- 20 El compuesto xxxx (2,59 g, 3,35 mmol) se disuelve en 20 ml de MeOH y se añaden 4 ml de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agita durante una noche y después se evapora de forma giratoria para dejar un residuo. El residuo se disuelve en agua y se neutraliza con 2 ml de HCl. Después, la solución neutralizada se extrae con EtOAc, produciendo 2,49 g (~100%) del compuesto xxxxi,



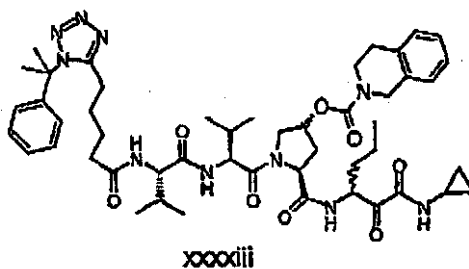
Ejemplo Intermedio 40 - Compuesto xxxxi

5 El compuesto xxxxi (847 mg, 1,16 mmol) y 724 mg (1,39 mmol) de PyBop se disuelven en 10 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto xiii (260 mg, 1,39 mmol) y después seguido de la adición de DIPEA (209 μ l). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, para dar 100 ml, y se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ y tres veces con salmuera. El producto orgánico se seca y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna (etanol al 5%/EtOAc), produciendo 930 mg (86%) del compuesto xxxxi,



10 Ejemplo Intermedio 41 - Compuesto xxxxi

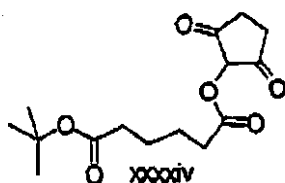
El compuesto xxxxi (350 mg, 0,38 mmol) se disuelve en 10 ml de DCM y se añaden 242 mg (0,57 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla se diluye con EtOAc, para dar 50 ml, y se lava tres veces con salmuera. El producto se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 100%), produciendo 180 mg (51%) del compuesto xxxxi,



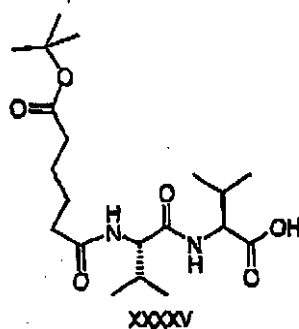
15

Ejemplo Intermedio 42 - Compuesto xxxxi

Se suspende H-Val-Val-OH (5 g, 23 mmol) en 100 ml de DMF, se añade el compuesto xxxxi

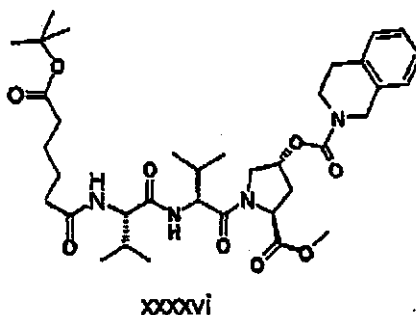


20 (8,3 g, 27,6 mmol), y después se añaden 6,2 ml (35,5 mmol) de DIPEA. La mezcla se agita a 40 °C durante dos días. El disolvente se retira a alto vacío y el residuo se disuelve en 100 ml de BtOAc y se lava tres veces con HCl 1 N y dos veces con salmuera. Se proporcionan 9,14 g (99%) del compuesto xxxxi.



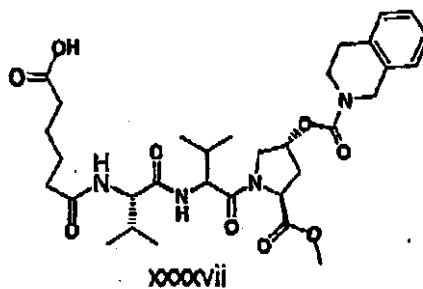
Ejemplo Intermedio 43 - Compuesto xxxvi

- 5 El compuesto xxxv (28 g, 7 mmol) y 954 mg (7 mmol) de HOAt se disuelven en 100 ml de DCM. Se añaden 7 ml de DCC 1 M/DCM. A la mezcla de reacción se le añade el compuesto xxxix (2,15) y la mezcla de reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en EtOAc y se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 100%), produciendo 4,57 g (95%) del compuesto xxxvi,



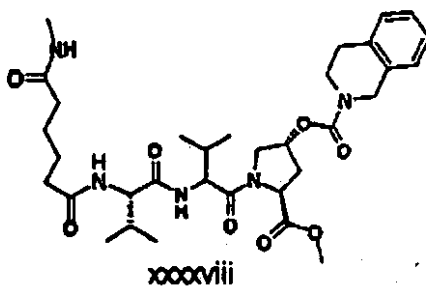
Ejemplo Intermedio 44 - Compuesto xxxvii

- 10 El compuesto xxxvi (4,57 g, 6,65 mmol) se disuelve en 10 ml de TEA y 10 ml de DCM. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se retira al vacío y el residuo se disuelve en 50:50 de acetonitrilo/agua y se liofiliza, produciendo en forma de un polvo el compuesto xxxvii,



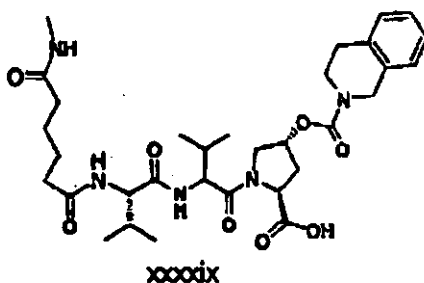
Ejemplo Intermedio 45 - Compuesto xxxviii

- 15 El compuesto xxxvii (1 g, 1,59 mmol) y 990 mg (2,28 mmol) de PyBop se disuelven en 20 ml de DCM y se añaden 1,6 ml de metilamina 1 M en THF. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluye, para dar 100 ml con EtOAc y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera. El residuo se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOH al 10%/EtOAc), produciendo 1 g (98%) del compuesto xxxviii,



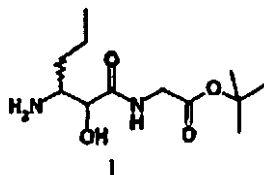
Ejemplo Intermedio 46 - Compuesto xxxix

5 El compuesto xxxviii (1 g, 1,55 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH 1 N. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retira por evaporación. El residuo se disuelve en agua, se neutraliza y se extrae con EtOAc, produciendo 960 mg (98%) del compuesto xxxix,



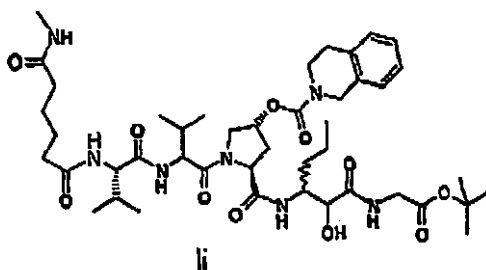
Ejemplo Intermedio 47 - Compuesto li

El compuesto xxxix (315 mg, 0,5 mmol) y 312 mg (0,6 mmol) de PyBop se disuelven en 10 ml de DCM. Se añaden el compuesto 1 (56 mg, 0,6 mmol) y 108 μ l de DIPEA. La mezcla



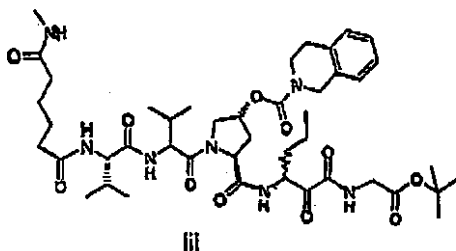
10

se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche, se diluye, para dar 100 ml con EtOAc y se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera. Se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 15%/EtOAc), produciendo 400 mg (92%) del compuesto li,



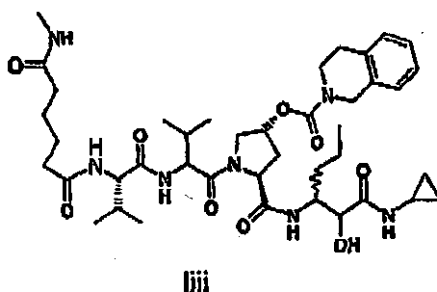
15 Ejemplo Intermedio 48 - Compuesto lii

El compuesto li (400 mg, 0,46 mmol) se disuelve en 10 ml de DCM y se añaden 292 mg (0,69 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación y el producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 130 mg (32%) del compuesto lii,



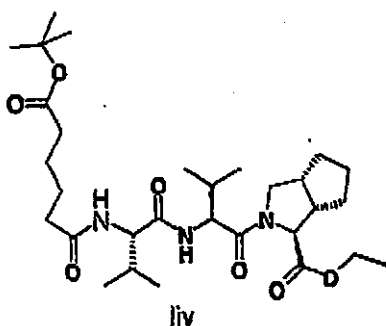
Ejemplo Intermedio 49 - Compuesto lili

- 5 El compuesto xxxix (210 mg, 0,33 mmol) y 208 mg (0,4 mmol) de PyBop se disuelven en 10 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto xiii (154 mg, 0,83 mmol) seguido de la adición de DIPEA (72 μ l 0,4 mmol). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluye, para dar 100 ml con EtOAc, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera, y después se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOH al 10%/EtOAc), produciendo 250 mg (95%) del compuesto lili,

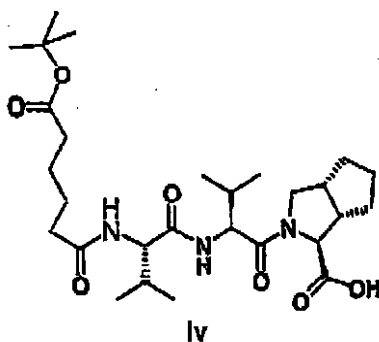


Ejemplo Intermedio 50 - Compuesto liv

- 10 El compuesto xxxv (755 mg, 1,88 mmol) y 255 mg (1,88 mmol) de HOAt se disuelven en 20 ml de DCM. Se añaden 1,88 ml de DCC 1 M/DCM. A la mezcla de reacción se le añade el compuesto v (288 mg) y la mezcla de reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentra a sequedad, y el residuo se disuelve en EtOAc y se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 80%/Hexanos), produciendo 800 mg (90%) del compuesto liv,

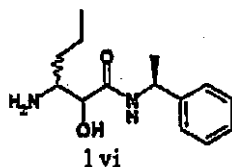


- 15
- #### Ejemplo Intermedio 51 - Compuesto lv
- 20 El compuesto liv (800 mg, 1,41 mmol) se disuelve en 10 ml de MeOH y se añaden 2 ml de NaOH. La mezcla se agita a aproximadamente la temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retira al vacío, y el residuo se disuelve en agua y se neutraliza con 2 ml de HCl 1 N. El producto se extrae con EtOAc. La evaporación del disolvente de extracción proporcionó 760 mg (~100%) de lv,



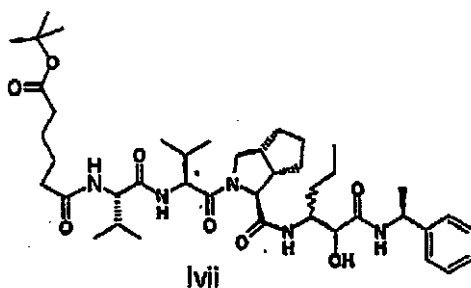
Ejemplo Intermedio 52 - Compuesto Ivii

El compuesto Iv (760 mg, 1,41 mmol) y 880 mg (1,69 mmol) de PyBop se disuelven en 5 ml de DCM. A la solución se le añade el compuesto Ivi (530 mg, 2,12 mmol) y después se añaden 0,31



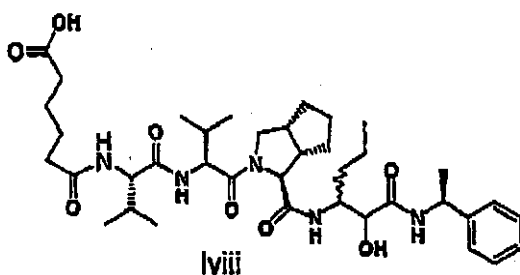
5

de DIPEA. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluye, para dar 100 ml con EtOAc, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera, y después se purifica por cromatografía ultrarrápida en columna (EtOAc al 100%), produciendo 870 mg (80%) del compuesto Ivii,



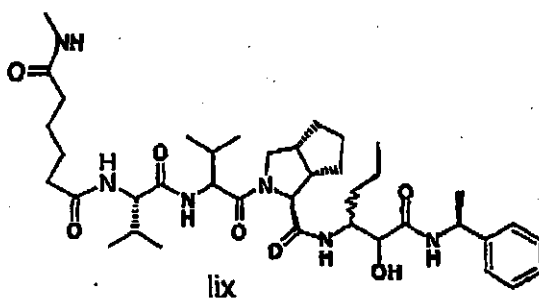
10 Ejemplo Intermedio 53 - Compuesto Iviii

El compuesto Ivii (350 mg, 0,45 mmol) se disuelve en 5 ml de TFA y 5 ml de DCM y la mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación y el producto se purifica por RP-HPLC, produciendo 220 mg (69%) del compuesto Iviii,



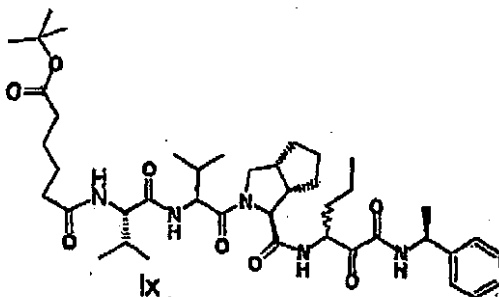
15 Ejemplo Intermedio 54 - Compuesto Ilix

El compuesto Iviii (200 mg, 0,28 mmol) y 218 mg (0,42 mmol) de PyBop se disuelven en 5 ml de DCM. Se añade metilamina (0,28 ml de 2 M en THF). La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluye, para dar 100 ml con EtOAc, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ y salmuera, y después se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 15%/ EtOAc), produciendo 168 mg (79%) de Ilix,



Ejemplo Intermedio 55 - Compuesto lix

El compuesto lviii (200 mg, 0,26 mmol) se disuelve en 4 ml de DCM y se añaden 165 mg (0,39 mmol) de reactivo de DMP. La mezcla se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se retira por evaporación. El residuo se disuelve en acetonitrilo al 50%/agua, se filtra y se purifica por RP-HPLC, produciendo 140 mg (70%) del compuesto lix,

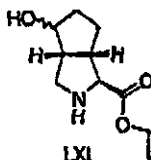


Ejemplo Intermedio 56 - Compuesto ii

Una solución en DCM (30 ml) y EtOH (30 ml) del compuesto i (4 g, 12,1 mmol), en atmósfera de N₂, se enfría a -10 °C. Se añade NaBH₄ (458 mg, 12,1 mmol) y la solución se agita a -10 °C durante 50 minutos. El análisis por TLC (EtOAc al 50%/Hexano) mostró una conversión total en una mancha de realización más lenta. La reacción se interrumpe cuidadosamente con hielo y después con una solución saturada fría de NH₄Cl (10 ml). La mezcla se vierte en DCM (300 ml). La fase orgánica se lava una vez con una solución saturada de NH₄Cl (60 ml) y dos veces con salmuera (60 ml). Después, la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y se concentra al vacío, produciendo 3,5 g del compuesto ii (87%)

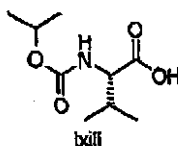
Ejemplo Intermedio 57 - Compuesto lxi

En un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un globo H₂, una solución etanólica (50 ml) del compuesto ii (3,5 g, 10,5 mmol) se somete a condiciones de hidrogenación convencionales [PD(OH)₂ al 20%/C (1,47 g, 2,1, mmol)] durante 5 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. El catalizador se retira por filtración a través de Celite y se lava con DCM. Después, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo 2 g (96%) del compuesto lxi,

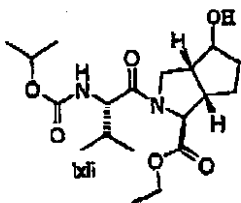


Ejemplo Intermedio 58 - Compuesto lxiii

En una atmósfera inerte, una solución del compuesto lxi (200 mg, 1 mmol), el compuesto lxiii,

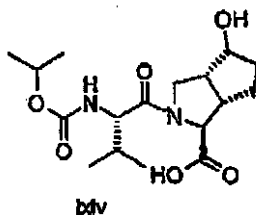


- 5 (233 mg, 1,1 mmol), HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) (156 mg, 1,15 mmol) en DMF anhidra (6 ml) se agita durante 20 minutos. Después, la temperatura se disminuye hasta 0 °C seguida de la adición de DIC (0,18 ml, 1,15 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente. La solución se diluye con EtOAc y después se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. El residuo se limpia por cromatografía (gel de sílice: EtOAc al 70%/DCM), para dar el compuesto Ixii con un rendimiento del 45%.



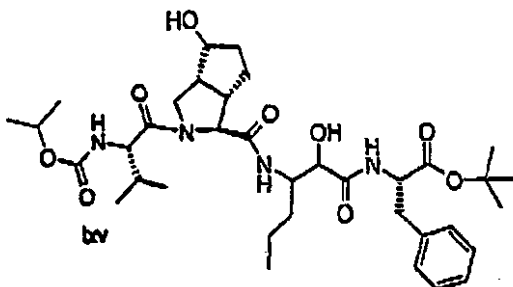
Ejemplo Intermedio 59 - Compuesto Ixiv

- 10 Una solución del compuesto Ixii (777 mg, 2 mmol) en dioxano (6 ml) y NaOH 0,5 M (6 ml) se agita durante 5 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. El examen por TLC (EtOAc al 100%) muestra una conversión completa en una mancha al principio. La reacción se enfría con un baño de hielo seguido de la adición de HCl 1 N (4 ml). Después, se añade NaCl sólida y toda la mezcla se extrae dos veces con EtOAc (2 x 150 ml). Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida, para dar el compuesto Ixiv con un rendimiento del 92%.



- 15 **Ejemplo Intermedio 60 - Compuesto Ixv**

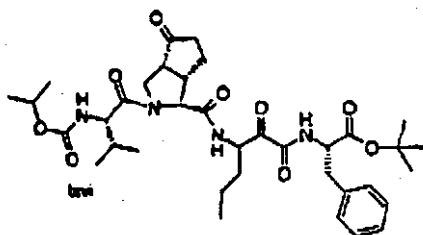
- 20 En una atmósfera inerte, una solución del compuesto x (203 mg, 0,58 mmol), el compuesto Ixiv (276 mg, 0,775 mmol), HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) (126 mg, 0,93 mmol) en DMF anhidra (6 ml) se agita durante 20 minutos. Después, la temperatura se disminuye hasta 0 °C seguida de la adición de DIC (0,14 ml, 0,93 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente. La solución se diluye con EtOAc y después se lava dos veces con HCl 1 N, dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el disolvente se retira a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía (gel de sílice: EtOAc al 50%/DCM con respecto a 80:19:1 de EtOAc/DCM/MeOH), para dar el compuesto Ixv con un rendimiento del 62%.



- 25 **Ejemplo Intermedio 61 - Compuesto Ixvi**

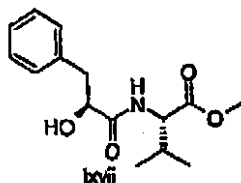
- 30 En una atmósfera inerte, a una solución del compuesto Ixv (287 mg, 0,42 mmol) en DCM anhidro (15 ml) se le añade el reactivo de DMP (605 mg, 1,43 mmol). La reacción se agita durante 2 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. (Nota. La duplicación de la cantidad del reactivo de DMP y el tiempo de reacción sirve para garantizar que ambos grupos alcohol se oxidan por completo, para dar los grupos ceto correspondientes). El examen por TLC (gel de sílice: MeOH al 2%/EtOAc) muestra una conversión completa en el producto más rápido. La reacción se diluye con DCM (150 ml) y después se lava dos veces con una solución acuosa al 10% de sulfito sódico (2 x 50 ml), dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y con salmuera. La fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO₄ y el

disolvente se retira a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía (gel de sílice: EtOAc al 50%/DCM con respecto a 80:19:1 de EtOAc/DCM/MeOH), para dar el compuesto **lxvi** con un rendimiento del 77%.



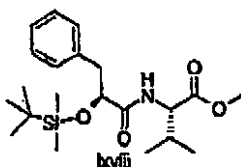
Ejemplo Intermedio 62 - Compuesto **lxvii**

- 5 A una solución en DCM (60 ml) de ácido L-3 fenil láctico (2 g, 12 mmol) se le añade PyBOP (7,5 g, 14,4 mmol). A esta solución se le añade una solución en DCM (20 ml) que contiene éster metílico de L-valina HCl (2,4 g, 14,4 mmol) y DIPEA (2,6 ml, 14,4 mmol). La mezcla de reacción resultante se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente. En este momento, la reacción se diluye con EtOAc (30 ml), se lava con NaHCO₃ (30 ml) y salmuera (15 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 50%/Hex sobre gel de sílice, para dar 2,97 g (89%) del compuesto **lxvii**,



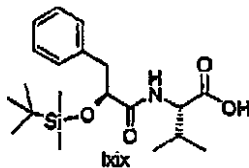
Ejemplo Intermedio 63 - Compuesto **lxviii**

- 15 El compuesto **lxvii** (2,97 g, 10,6 mmol) se recoge en DCM (50 ml) y se enfría con un baño de hielo. A esta solución se le añade TBSCl (2,1 g, 13,8 mmol) seguido de imidazol (0,94 g, 13,8 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. Después, la reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 20%/Hexano sobre gel de sílice, para dar 3,79 g (90%) del compuesto **lxviii**,



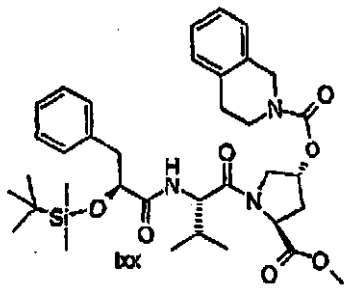
Ejemplo Intermedio 64 - Compuesto **lxix**

- 20 A una solución en metanol (50 ml) del compuesto **lxviii** (3,78 g, 9,6 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (14,4 ml, 14,4 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. El disolvente se elimina parcialmente al vacío. Después, el pH de la mezcla de reacción se reduce hasta 3 usando una solución acuosa 1 N de HCl. La solución se diluye con EtOAc y salmuera. El producto deseado se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, para dar 3,5 g (96%) del compuesto **lxix**,



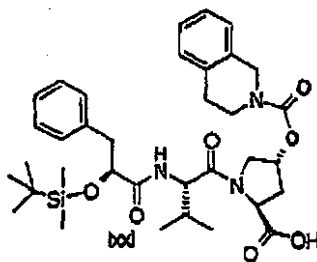
- 25 **Ejemplo Intermedio 65 - Compuesto **lxx****
- 30 A una solución en DCM (15 ml) que contiene el compuesto **lxix** (1,1 g, 2,9 mmol) se le añade HOAt (0,44 g, 3,2 mmol) seguido de una solución 1 M de DCC (3,2 ml, 3,2 mmol) en DCM. Después de agitar a aproximadamente la temperatura ambiente durante 20 minutos, se añade una solución en DCM (15 ml) del compuesto **xxxix** (970 mg, 3,2 mmol). Esta reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. Después, la reacción se diluye con EtOAc

(30 ml), se filtra a través de una capa de gel de sílice, se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra al vacío. La purificación se consigue en EtOAc al 50%/Hex sobre gel de sílice, para dar 1,5 g (77%) del compuesto lxx,



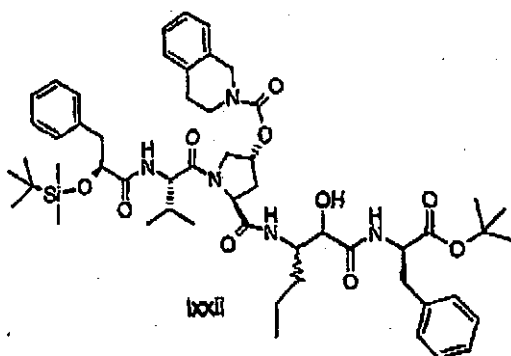
5 Ejemplo Intermedio 66 - Compuesto lxxi

A una solución en metanol (30 ml) del compuesto xx (1,5 g, 2,4 mmol) se le añade NaOH acuoso 1 N (3,6 ml, 3,6 mmol). La solución resultante se agita durante una noche. En este momento, el disolvente se elimina parcialmente, y el pH de la mezcla de reacción se ajusta a 3 usando HCl acuoso 1 N. Después, la reacción se diluye con EtOAc (50 ml) y salmuera (20 ml). La fase acuosa se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, para dar 1,3 g (92%) del compuesto lxxi,



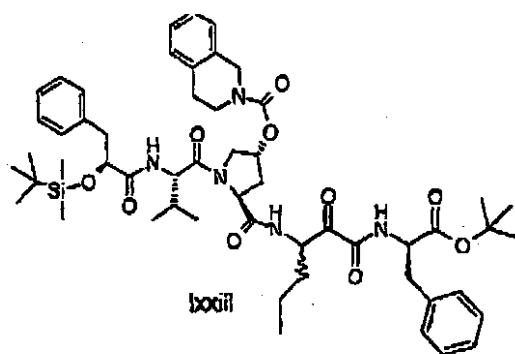
15 Ejemplo Intermedio 67 - Compuesto lxxii

A una solución de DCM (2 ml) que contiene el compuesto lxxi (180 mg, 0,28 mmol) se le añaden PyBOP (175 mg, 0,34 mmol) y DIPEA (0,06 ml, 0,34 mmol) seguido de una solución en DCM (3 ml) del compuesto x (150 mg, 0,41 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. Después, la reacción se diluye con EtOAc (30 ml), se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 100% sobre gel de sílice, para dar 270 mg (98%) del compuesto lxxii.



20 Ejemplo Intermedio 68 - Compuesto lxxiii

A una solución en DCM (3 ml) del compuesto lxxii (270 mg, 0,27 mmol) se le añade el reactivo de DMP (140 mg, 0,33 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 1,5 horas, la reacción se interrumpe con Na₂SO₃ al 10% (10 ml). La reacción se diluye con EtOAc (30 ml) y se agita durante 10 minutos. La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 60%/Hex, para dar 150 mg (56%) del compuesto lxxiii,

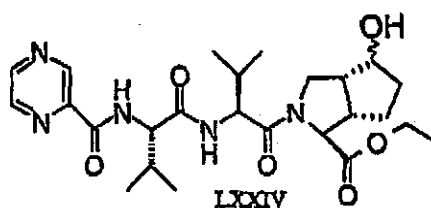


Ejemplo Intermedio 69 - Compuesto lxi

5 A una solución en etanol (50 ml) del compuesto ii (3,5 g, 10,5 mmol) se le añade en una corriente de nitrógeno Pd(OH)₂/C (1,47 g, contenido de Pd al 20%, 2,1 mmol). La reacción se somete a hidrogenación en 1 atm de presión. Tras la finalización, los catalizadores se filtran a través de una capa de Celite y se lavan con diclorometano. Los filtrados se concentran al vacío, para dar 2 g (96%) del compuesto lxi.

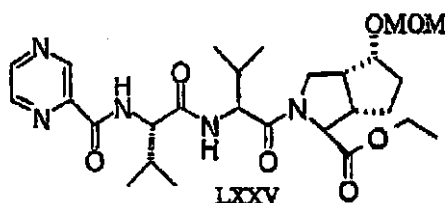
Ejemplo Intermedio 70 - Compuesto lxxiv

10 A una solución en DMF (60 ml) del compuesto vii (9,1 g, 28,2 mmol) se le añaden HOAt (4 g, 29,4 mmol) y 1,3-disiopropilcarbodiimida (3,7 g, 29,4 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 30 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en DMF (10 ml) del compuesto lxi (5,1 g, 25,6 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, los sólidos de color blanco se retiran por filtración. Los filtrados se concentran al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, para dar 9,5 g (67%) del compuesto lxxiv,



15 Ejemplo Intermedio 71 - Compuesto lxxv

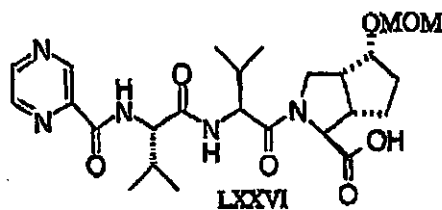
20 A una solución del compuesto lxxiv (1,5 g, 3 mmol) en THF anhidro (25 ml) se le añade Et₃Pr₂N (0,78 ml, 4,5 mmol) a aproximadamente temperatura ambiente. La mezcla se enfría a 0 °C y se añade de forma gota a gota MOMCl (1,5 ml, 19,7 mmol). La reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante una noche. Después, la solución se diluye con éter y se lava con agua (3 veces). Las fases acuosas se extraen adicionalmente por éter y todas las fases orgánicas se secan sobre MgSO₄ antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. El isómero deseado del compuesto lxxv se aísla por cromatografía sobre gel de sílice (5/2 de BtOAc/Hexanos)



con un rendimiento del 40% con una separación evidente de diastereómeros.

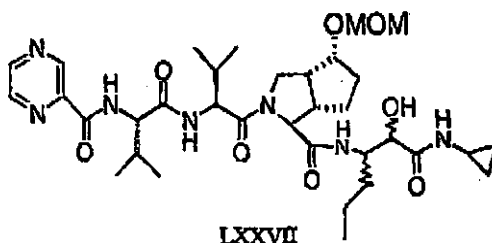
Ejemplo Intermedio 72 - Compuesto lxxvi

25 A una solución del compuesto lxxv (502 mg, 0,9 mmol) en EtOH (5 ml) se le añade gota a gota NaOH acuoso 2 N (0,9 ml, 1,8 mmol) a 0 °C. La reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante una noche. Tras la finalización de la saponificación, la solución se acidifica a pH 3 con resina ácida Dowex 50W8X-200. Los sólidos se retiran por filtración y el filtrado resultante se concentra al vacío, para dar un residuo oleoso que se liofiliza, para dar 370 mg (80%) del compuesto lxxvi,



Ejemplo Intermedio 73 - Compuesto lxxvii

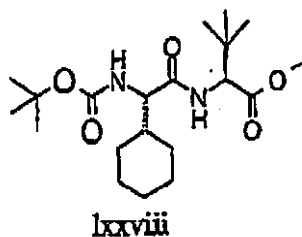
5 Una solución en diclorometano (4 ml) del compuesto lxxvi (110 mg, 0,21 mmol) se trata con PyBOP (200 mg, 0,38 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla de reacción se carga con una solución en THF (3,2 ml) del compuesto xiii (60 mg, 0,32 mmol) seguido de Et_3N . Después de agitar durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO_4 , antes de concentrarse, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 143 mg (100%) del compuesto lxxvii.



10

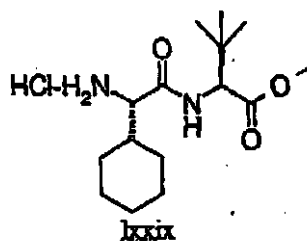
Ejemplo Intermedio 74 - Compuesto lxxviii

15 A una solución en THF (50 ml) de H-Chg-OH 2 (5 g, 19,4 mmol) se le añaden HOBt (2,63 g, 19,4 mmol) y EDCI (3,72 g, 19,4 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 20 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en THF (19 ml) y DMF (10 ml) que contiene clorhidrato de éster metílico de *tert*-L-Leucina (19,4 mmol) y DIPEA (6,75 ml, 38,8 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. El tratamiento acuoso convencional y la cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 15-20%/Hexanos) proporcionan 2,27 g (30%) del compuesto lxxviii,



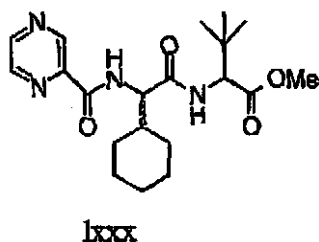
Ejemplo Intermedio 75 - Compuesto lxxix

20 A una solución en THF (12 ml) del compuesto lxxviii (2,27 g, 5,91 mmol) se le añade una solución 4 N de HCl en dioxano (7,38 ml, 29,5 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo el compuesto lxxix que se usa directamente para la siguiente reacción.

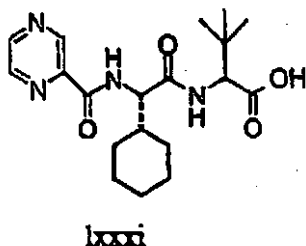


Ejemplo Intermedio 76 - Compuesto lxxx

- 5 A una solución en THF del compuesto lxxix (5,9 mmol) se le añade una solución de THF (20 ml) que contiene ácido 2-pirazinacarboxílico (878 mg, 7,08 mmol), HOBt (957 mg, 7,08 mmol) y EDCI (1,36 g, 7,08 mmol). Después, a la mezcla resultante se le añade DIPEA (2,05 ml, 11,8 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40-50%/Hexanos), para dar 1 g (36%) del compuesto lxxx,

**Ejemplo Intermedio 77 - Compuesto lxxxi**

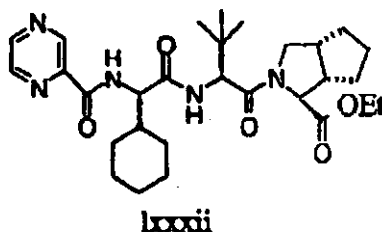
- 10 A una solución en metanol (20 ml) del compuesto lxxx (1 g, 2,56 mmol) se le añade NaOH 2 N (3,2 ml, 6,4 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se acidifica a pH 3 usando HCl 5 N. La reacción se diluye con EtOAc (75 ml) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se disuelve en 1:1 de CH₃CN/H₂O para la liofilización. Se obtiene un total de ~1 g (100%) del compuesto lxxxi.



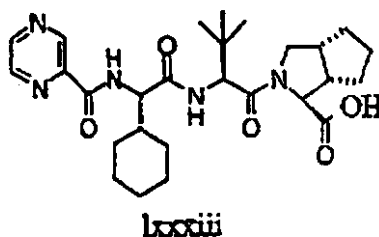
15

Ejemplo Intermedio 78 - Compuesto lxxxii

- 20 Una solución en diclorometano (10 ml) del compuesto lxxxi (2,56 mmol) se trata con HOAt (348 mg, 2,56 mmol) y DCC (2,56 ml, 1 M, 2,56 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (5 ml) del compuesto v (2,56 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, los sólidos de color blanco (urea) se retiran por filtración. Los filtrados se concentran al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, para dar 1,4 g (100%) del compuesto lxxxii,

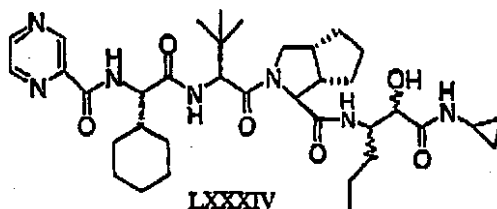
**Ejemplo Intermedio 79 - Compuesto lxxxiii**

- 25 Una solución en etanol (15 ml) del compuesto lxxxii (1,4 g, 2,58 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,58 ml, 5,17 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con resina ácida. Los sólidos se retiran por filtración. Los filtrados resultantes se concentran al vacío, para dar un residuo que se liofiliza, para dar 1,32 g (~100%) del compuesto lxxxiii,



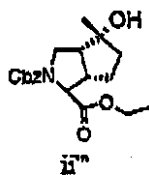
Ejemplo Intermedio 80 - Compuesto lxxxiv

Una solución en diclorometano (15 ml) del compuesto lxxxiii (360 mg, 0,7 mmol) se trata con PyBOP (582 mg, 1,12 mmol). Después de agitar a aproximadamente temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (10 ml) del compuesto xiii (195,6 mg, 1,05 mmol) seguido de DIPEA (0,25 ml, 1,40 mmol). Después de agitar durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con BtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3%/EtOAc), para dar 420 mg (88%) del compuesto lxxxiv,



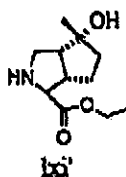
Ejemplo Intermedio 81 - Compuesto ii'''

Una mezcla de diclorometano anhidro y éter (20 ml:20 ml) se enfría a -78 °C en una atmósfera de N₂ (g). A la solución se le añade TiCl₄ (1 M en diclorometano, 10 ml, 10 mmol) y después se le añade posteriormente MeLi (1,4 M en éter, 7,1 ml, 10 mmol) con agitación durante 30 minutos más a 78 °C. A la mezcla se le añade gota a gota una solución del compuesto i (2 g, 6 mmol) en 10 ml de diclorometano a la misma temperatura durante 15 minutos. La solución se calienta lentamente hasta -40 °C durante 10 minutos y después se agita a 0 °C durante 2 horas. La reacción se interrumpe vertiendo la mezcla en una mezcla de agua/éter (1:1) y después las fases se dejan separar. La fase acuosa se extrae adicionalmente dos veces con éter. Todas las fases orgánicas se lavan con agua, salmuera y se secan sobre MgSO₄ antes de concentrarse, para dar un aceite de color amarillo. El compuesto ii''' deseado se aísla por cromatografía sobre gel de sílice (2/1 de EtOAc/Hexanos) con un rendimiento del 83%.



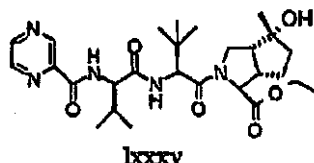
Ejemplo Intermedio 82 - Compuesto lxi'

Al compuesto ii''' (1,7 g, 5 mmol) se le añade Pd al 10% en peso sobre C (0,53 g, 0,5 mmol) seguido de la adición de MeOH (17 ml). El gas hidrógeno se lava abundantemente a través de la mezcla de reacción y el gas hidrógeno se mantiene para una reacción a 1 atm durante una noche. Después, la mezcla de reacción se filtra y se concentra, para dar 929 mg (87%) del compuesto lxi' en forma de un aceite incoloro.



Ejemplo Intermedio 83 - Compuesto lxxxv

A una solución en THF (16 ml) del compuesto xxii (1 g, 3 mmol) se le añade a aproximadamente la temperatura ambiente HOAt (0,41 g, 3 mmol) y seguido de una solución 1 M en DCC de diclorometano (3 ml, 3 mmol). Después de agitar durante 30 minutos aproximadamente a la temperatura ambiente, al ácido activado por HOAt anterior se le añade una solución en diclorometano (6 ml) del compuesto lxi'. La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la reacción se filtra a través de Celite. El filtrado se diluye con EtOAc (120 ml) y se lava con agua y después con salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, para dar un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 100%), produciendo 1 g (65%) del compuesto lxxxv,

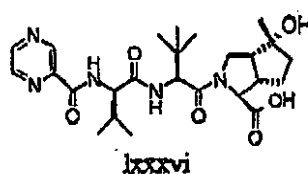


10

Ejemplo Intermedio 84 - Compuesto lxxxvi

A una solución en etanol (8 ml) del compuesto lxxxv (920 mg, 1,7 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (1,7 ml, 3,4 mmol). La reacción se agita durante una noche a aproximadamente temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 mediante una resina ácida Dowex. Los sólidos se retiran por filtración y el filtrado se concentra, para dar un aceite incoloro, que se disuelve de nuevo en 1:1 de CH₃CN/H₂O y se liofiliza, para dar 800 mg (93%) del compuesto lxxxvi. El análisis por HPLC muestra un único pico de producto.

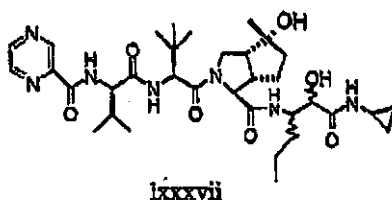
15

**Ejemplo Intermedio 85 - Compuesto lxxxvii**

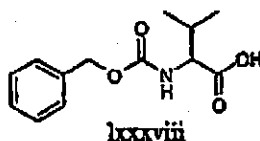
A una solución en diclorometano (4 ml) del compuesto lxxxvi (150 mg, 0,3 mmol) se le añade PyBOP (250 mg, 0,47 mmol). La solución se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade una solución en THF (4,5 ml) del compuesto xiii (84 mg, 0,45 mmol) seguido de Et₃N (0,1 ml, 0,6 mmol). La reacción se agita aproximadamente a la temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce 200 mg (100%) del compuesto lxxxvii,

20

25

**Ejemplo Intermedio 86 - Compuesto lxxxix**

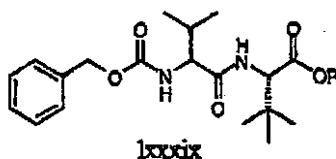
El compuesto lxxxviii, N-Cbz-L-Valina, (2,5 g, 9,9 mmol) se recoge en THF (30 ml), se añaden



30

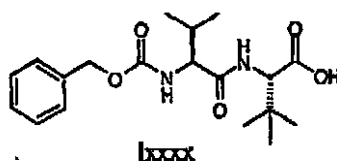
EDCI (2,29 g, 11,9 mmol) y HOBT (1,62 g, 11,9 mmol), y la mezcla se agita durante cinco minutos. Se añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-Leucina (2,17 g, 11,9 mmol) en THF (23,9 ml) seguido de DIPEA (2,1 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con

acetato de etilo, se lava con HCl 1 N, bicarbonato sódico saturado y salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra. El residuo concentrado se purifica en acetato de etilo al 25%/hexano, para dar 1,1 g (29%) del compuesto lxxxix,



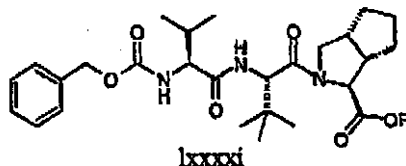
5 Ejemplo Intermedio 87 - Compuesto lxxxx

El compuesto lxxxix se hidroliza en condiciones convencionales usando alcohol metílico (0,3 M) y NaOH 1 N (1,5 equiv.), para dar 1,03 g (95%) del compuesto lxxxx,

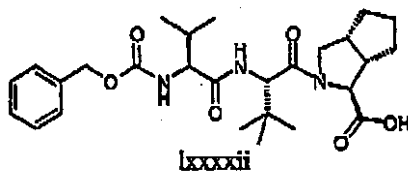


Ejemplo Intermedio 88 - Compuesto lxxxxi

- 10 El compuesto lxxxx (385 mg, 1,06 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade DCC (1,4 mmol) seguido de HOAt (190 mg, 1,4 mmol). Después, se añade el compuesto v (260 mg, 1,4 mmol) en diclorometano (3 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se diluye con acetato de etilo, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo se purifica en acetato de etilo al 50%/hexano, para dar 440 mg (80%) del compuesto lxxxxi,

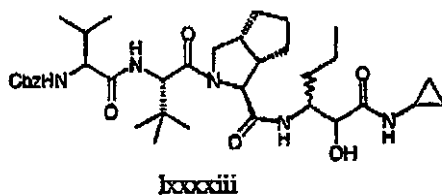


- 15 **Ejemplo Intermedio 89 - Compuesto lxxxxii**
- El compuesto lxxxxi se hidroliza en condiciones convencionales usando alcohol etílico (0,3 M) y NaOH 1 N (1,5 equiv.), para dar 390 mg del compuesto lxxxxii,

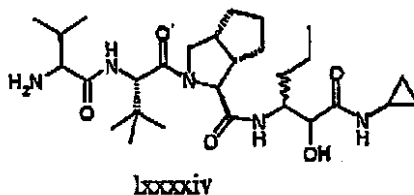


20 Ejemplo Intermedio 90 - Compuesto lxxxxiii

El compuesto lxxxxii (350 mg, 0,7 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade PyBOP (480 mg, 0,91 mmol) seguido del compuesto xiii (170 mg, 0,91 mmol). Se añade DIPEA (0,16 ml, 0,91 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante una noche. La mezcla de reacción se concentra y se purifica en acetato de etilo al 100%, para dar 420 mg (90%) del compuesto lxxxxiii,

**Ejemplo Intermedio 91 - Compuesto lxxxiv**

El compuesto lxxxiii se hidrogena usando Pd al 10%/C (1% en mol) en alcohol metílico en una atmósfera de hidrógeno, para dar 335 mg (100%) del compuesto lxxxiv,

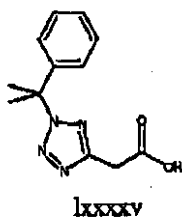


5

Ejemplo Intermedio 92 - Compuesto lxxxv

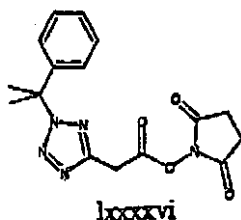
Se recoge 1H-tetrazol-5-acetato de etilo (5 g, 32 mmol) en cloroformo (80 ml). Se añade ácido tricloroacético (12,03 g, 73,65 mmol) seguido de alfa metil estireno (3,78 g, 32 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche. Al día siguiente, la solución se diluye con acetato de etilo, se lava con KOH al 10% y salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra, para dar 8 g (96%) del tetrazol-5-acetato de etilo N-protegido correspondiente. Este material se somete a condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol etílico (0,3 M) y NaOH 1 N (3 equiv.), para dar 7 g (99%) del compuesto lxxxv,

10

**Ejemplo Intermedio 93 - Compuesto lxxxvi**

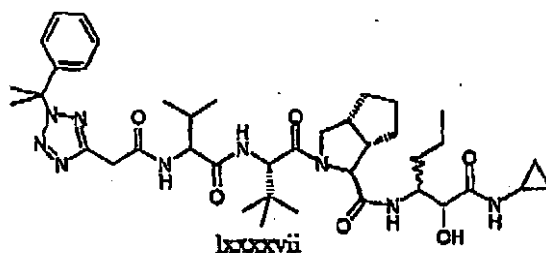
El compuesto lxxxv (3,62 g, 14,7 mmol) se recoge en diclorometano (50 ml). Se añaden EDCI (432 g, 22,1 mmol) y DIPEA (5,1 ml, 29,4 mmol) y se agitan durante cinco minutos. Se añade N-hidroxisuccinimida (3,38 g, 29,4 mmol) y se agita durante tres horas. La reacción se diluye con diclorometano y se lava tres veces con agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra, para dar 3,66 g (73%) del compuesto lxxxvi,

15

**Ejemplo Intermedio 94 - Compuesto lxxxvii**

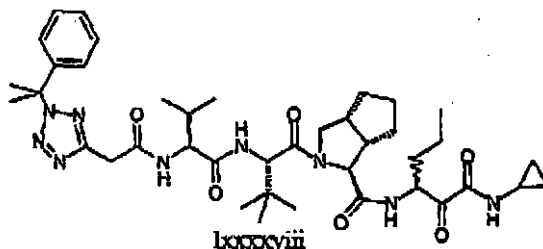
El compuesto lxxxiv (335 mg, 0,62 mmol) y el compuesto lxxxvi (343 mg, 1 mmol) se recogen en diclorometano (6 ml). Se añade DIPEA (0,17 ml, 1 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante una noche. La reacción se diluye con acetato de etilo, se lava con bicarbonato sódico saturado y salmuera y se concentra. El residuo se purifica en alcohol etílico al 5%/acetato de etilo, para dar 80 mg (16%) del compuesto lxxxvii,

20



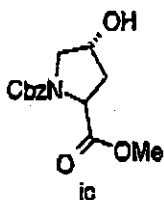
Ejemplo Intermedio 95 - Compuesto lxxxviii

- 5 El compuesto lxxxvii (80 mg, 0,11 mmol) se recoge en diclorometano (3 ml). Se añade el reactivo de DMP (55 mg, 0,13 mmol) y se agita durante una hora. La mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo y se inactiva con una solución al 10% de sulfito sódico. La fase orgánica se lava con bicarbonato sódico saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra y el residuo resultante se purifica en acetato de etilo al 100%, para dar 40 mg (48%) del compuesto lxxxviii,

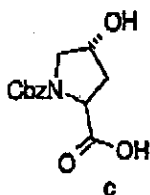


Ejemplo Intermedio 96 - Compuesto xxxix

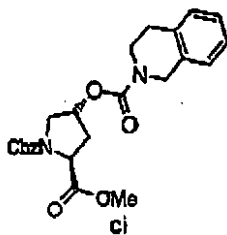
- 10 El compuesto ic, éster metílico de N-Cbz-4-Hidroxi Pro (2,1 g, 7,9 mmol), se prepara con



rendimiento cuantitativo a partir del compuesto c, N-Cbz-4-hidroxi Pro) y se disuelve en DCM (25



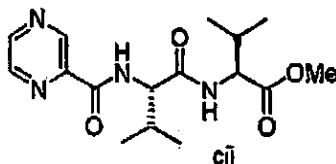
- 15 ml). A la solución se le añaden CDI (1,54 g, 9,5 mmol) y DIPEA (1,7 ml, 9,5 mmol) y se agita durante 10 minutos. A la mezcla de reacción se le añade gota a gota 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (TIQ) (1,2 ml, 9,5 mmol) y se agita durante cinco horas. La fase orgánica se lava con agua, HCl 1 N y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 40%/Hexanos, produciendo el compuesto ci, éster metílico de N-Cbz-4-TIQcarboniloxi-Pro, (2,5 g, 75%).



5 El compuesto ci (2,5 g, 5,9 mmol) se disuelve en MeOH (75 ml). La solución se lava abundantemente con N₂ y se añade Pd/C (10%, 300 mg). La mezcla de reacción se lava abundantemente con H₂ y se agita durante una noche. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra, produciendo el compuesto xxxix, 4-(TIQ-carboniloxi)-Pro, éster metílico, (1,49 g, 83%).

Ejemplo Intermedio 97 - Compuesto vii

El compuesto cii, éster metílico de N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val, (10,9 g, 32,4 mmol)

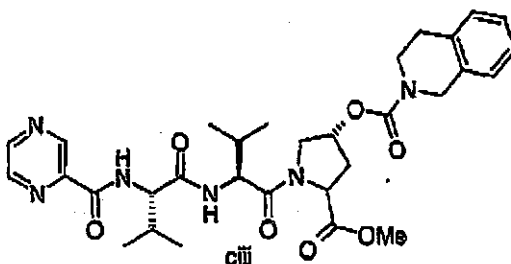


10 se disuelve en THF (80 ml), y después se añade NaOH acuoso (48,6 ml, 48,6 mmol). La mezcla resultante se agita 48 horas, y después se añade más cantidad de NaOH (16,3 ml, 16,3 mmol), y la mezcla se calienta a 40 °C durante tres horas. Después, el pH de la mezcla de reacción se reduce hasta 3, y la fase acuosa se extrae con EtOAc y después se concentra, produciendo el compuesto vii en bruto, ácido N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val (10,6 g, 100%).

Ejemplo Intermedio 98 - Compuesto ciiv

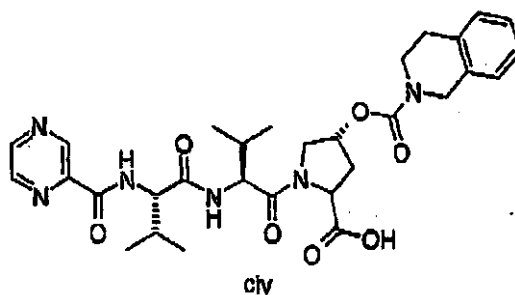
15 El compuesto cii (4,1 g, 12,7 mmol) se disuelve en DCM (20 ml). A esta solución se le añaden HOAt (1,73 g, 12,7 mmol) y DCC (12,7 mmol), y la solución se agita durante una hora. A la mezcla de reacción se le añade el compuesto xxxix (3,22 g, 10,6 mmol) en DCM (10 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc del 50% al 80%/Hexanos), produciendo el compuesto ciiv.

20 Éster metílico de N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val-4-(TIQcarboniloxi)-Pro, (5,27 g, 81,7%).



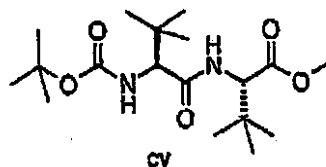
Ejemplo Intermedio 99 - Compuesto civ

25 El compuesto ciiv (650 mg, 1,29 mmol) se disuelve en THF (5 ml). A la solución se le añade NaOH acuoso (1,42 ml, 1,42 mmol) y después se agita durante una noche. El pH de la solución se reduce hasta 3, y la fase orgánica se aísla y se concentra, produciendo un residuo. El residuo se purifica usando HPLC de fase inversa en acetonitrilo/agua, produciendo el compuesto civ, ácido N-pirazin-2-ilcarbonil-Val-Val-4-(TIQcarboniloxi)-Pro, (600 mg, 95%).



Ejemplo Intermedio 100 - Compuesto cv

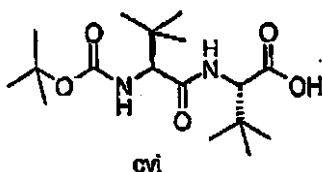
5 Se combinan N-Boc-L-*tert*-Leucina (2,3 g, 10 mmol) y clorhidrato de éster metílico de L-*tert*-Leucina (2 g, 11 mmol) en DMF (30 ml). Después, a la solución se le añade HOAt (1,6 g, 11,5 mmol). La mezcla resultante se agita durante 20 minutos en una atmósfera de N₂ y después se reduce a 0 °C, después de lo cual se añaden DIC (1,8 ml, 11,5 mmol) y 2,4,6-colidina (1,45 ml, 11 mmol). La solución resultante se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con un gradiente de EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto cv (3,3 g, 92%).



10

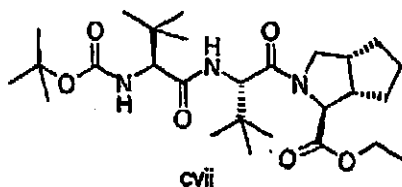
Ejemplo Intermedio 101 - Compuesto cvi

El compuesto cv (3,3 g, 9,2 mmol) se hidroliza usando dioxano (40 ml) y NaOH 0,5 N (37 ml, 18,4 mmol), produciendo el compuesto cvi (2,9 g, 92%).



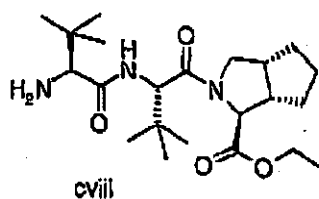
15 Ejemplo Intermedio 102 - Compuesto cvii

20 El compuesto cvi (2 g, 5,8 mmol) y el compuesto v (1 g, 5,5 mmol) se disuelven en DMF (20 ml). Después, a la solución se le añaden HOAt (832 mg, 6,6 mmol) y DIC (1,1 ml, 6,6 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con un gradiente de EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto cvii (2,4 g, 81%).



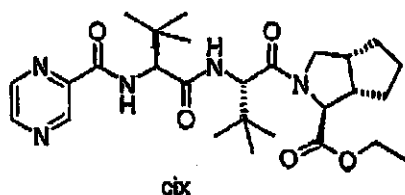
Ejemplo Intermedio 103 - Compuesto cviii

25 El compuesto cvii (2,4 g, 4,72 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). A la solución se le añade TFA (10 ml). La solución resultante se agita durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra, se disuelve en EtOAc, y después la fase orgánica se lava con NaOH 1 N y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cviii (1,084 g, 56,1%).



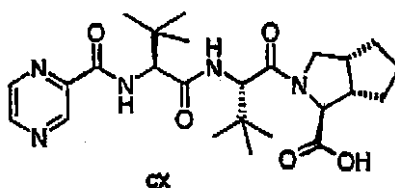
Ejemplo Intermedio 104 - Compuesto cix

5 Se disuelven ácido 2-pirazinacarboxílico (181 mg, 1,46 mmol) y el compuesto cviii (541 mg, 1,325 mmol) en DMF (15 ml). A la solución se le añaden HOAt (207 mg, 1,52 mmol) y DIC (0,24 ml, 1,52 mmol). La solución resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con un gradiente de EtOAc al 20%-30%-35%/hexanos, produciendo el compuesto cix (430 mg, 63%).



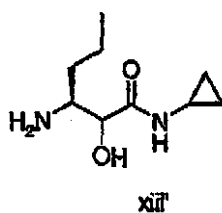
10 Ejemplo Intermedio 105 - Compuesto cx

El compuesto cix se hidroliza usando EtOH (7 ml) y NaOH 1 N (4,7 ml, 4,7 mmol), produciendo el compuesto cx (700 mg, 91,6%).

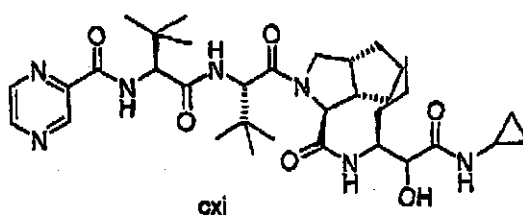


Ejemplo Intermedio 106 - Compuesto cxi

15 El compuesto cx (690 mg, 1,42 mmol) se disuelve en DCM (9 ml). Después, a la solución se le añade PyBOP (890 mg, 1,7 mmol) seguido de la adición del compuesto xiii' (320

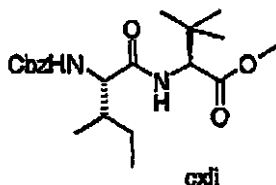


20 mg, 1,7 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,3 ml, 1,7 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cxi (490 mg, 52,7%).

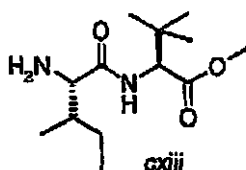


Ejemplo Intermedio 107 - Compuesto cxiv

El compuesto cxii (1,2 g, 3,06 mmol) se disuelve en MeOH (12 ml). Después del lavado abundante y minucioso

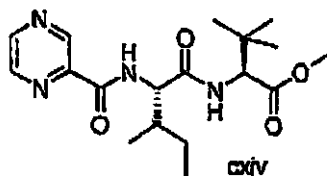


- 5 con N₂, se añade al Pd(OH)₂ 10% en peso sobre carbono (0,6 g) y la mezcla se hidrogena durante una noche, después de lo cual se muestra una mezcla de reacción completa por TLC (EtOAc al 30%/hexanos). La solución se aísla del material sólido por filtración y se concentra, para dar el compuesto cxiii desprotegido correspondiente en forma de un aceite incoloro (100%)



que se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional.

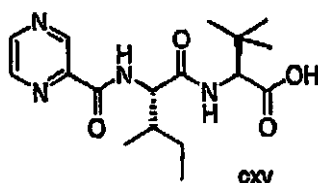
- 10 Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (400 mg, 3,2 mmol, 1,1 equiv.) en DCM/THF (4 ml/4 ml), y después se añaden HOAt (440 mg, 3,2 mmol) y DCC (343 mg, 1 M en DCM). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, el compuesto cxiii (0,96 g, 3,2 mmol) que se ha obtenido previamente se disuelve en DCM (6,4 ml) y se añade a la mezcla activada. Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite y el compuesto cxiv se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 30%/hexanos),



- 15 produciendo un sólido de color blanco (0,8 g, 80%).

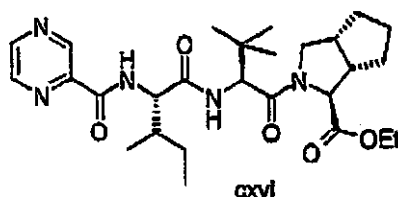
Ejemplo Intermedio 108 - Compuesto cxv

- 20 El compuesto cxiv (0,8 g, 2,2 mmol) se disuelve en MeOH (10 ml), y después se añade NaOH 2 N (ac.) (3,3 ml, 6,6 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual la finalización de la mezcla de reacción se indica por TLC (EtOAc al 50%/hexanos). La acidificación a pH 3 por HCl 5 N y la dilución con EtOAc se sigue de la extracción de la fase orgánica. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxv (0,74, 95%) tras la concentración.

**Ejemplo Intermedio 109 - Compuesto cxvi**

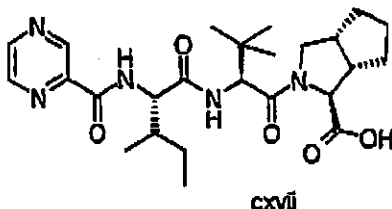
- 25 A una solución en DCM (6 ml) del compuesto cxv (0,74 g, 2,1 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (290 mg, 2,1 mmol) seguido de la adición de una solución 1 M de DCC en DCM (2,2 ml, 2,2 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, al ácido activado por HOAt anterior se le añade una solución en THF (10,5 ml, 0,2 M) del compuesto v (2,1 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. En este momento, la mezcla de reacción se filtra a través de celite. El filtrado se diluye con EtOAc (120 ml) y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, para dar un aceite de color amarillo que se
- 30

purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/hexanos), produciendo el compuesto cxvi (0,714 g, 66%).



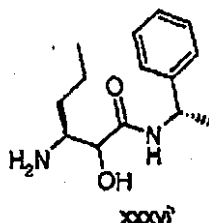
Ejemplo Intermedio 110 - Compuesto cxvii

- 5 A una solución en EtOH del compuesto cxvi (0,7 g, 1,4 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (2 ml, 4 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente, después se acidifica a pH 3 por HCl 5 N y se diluye con EtOAc seguido de la extracción de la fase orgánica. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxvii (95%) tras la concentración.

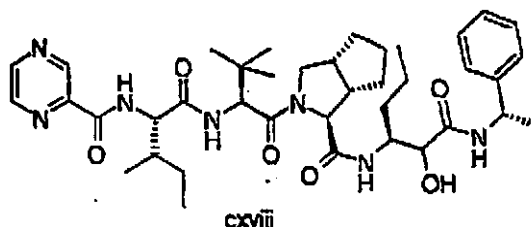


10 Ejemplo Intermedio 111 - Compuesto cxviii

A una solución en DCM/THF (10 ml/2 ml) del compuesto cxvii (300 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (416 mg, 0,8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xxxvi' (200 mg, 0,8 mmol), seguido de DIPEA

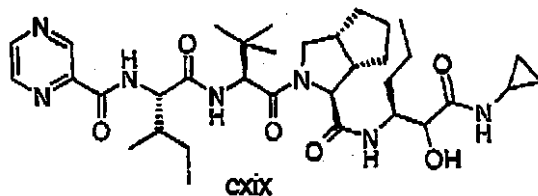


- 15 (0,22 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se inactiva con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3-5%/ EtOAc) produce el compuesto cxviii (335 mg, 76%).



20 Ejemplo Intermedio 112 - Compuesto cxix

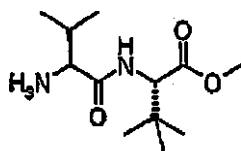
- 25 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto cxvii (340 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (470 mg, 0,9 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (170 mg, 0,9 mmol) seguido de DIPEA (0,24 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se inactiva con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3-50%/EtOAc) produce el compuesto cxix (164 mg, 36%).

**Ejemplo Intermedio 113 - Compuesto xx**

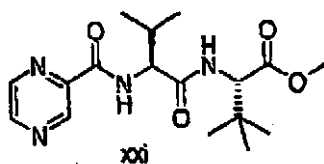
5 Se disuelve N-Cbz-L-Valina (6,28 g, 25 mmol) en DCM (30 ml). A esta solución se le añaden HOBt (3,38 g, 25 mmol) y DCC (25 ml, solución 1 M) y se agita durante cinco minutos. A esta mezcla se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*terc*-Leucina (25 ml, solución 1 M) y se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía con EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto xx (2,96 g, 31%).

Ejemplo Intermedio 114 - Compuesto xxi

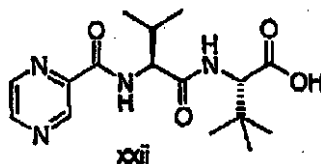
10 El compuesto xx (2,95 g, 7,8 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (800 mg) en MeOH (40 ml) en una atmósfera de H₂, produciendo la amina libre correspondiente que se muestra a continuación (1,9 g, 100%).



15 Se disuelve ácido 2-pirazina-carboxílico (970 mg, 7,8 mmol) en DCM (20 ml). A esta solución se le añade PyBOP (4,06 g, 7,8 mmol). A la solución se le añade la amina libre (1,9 g, 7,8 mmol) en DCM (15 ml), y después se añade DIPEA (1,36 ml, 7,8 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica por cromatografía con EtOAc al 30%-40%/Hexanos, produciendo el compuesto xxi (2,07 g, 75,8%).

**Ejemplo Intermedio 115 - Compuesto xxii**

20 El compuesto xxi se hidroliza usando MeOH (20 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto xxii (1,82 g, 93,9%).

**Ejemplo Intermedio 116 - Compuesto xxiii**

25 El compuesto xxii (895 mg, 2,66 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). A la solución se le añade DCC (3,2 mmol), después se añade HOAt (435 mg, 3,2 mmol), y después se añade el compuesto v (3,2 mmol) en THF (16 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 50%/hexanos, produciendo el compuesto xxiii (730 mg, 54,8%).

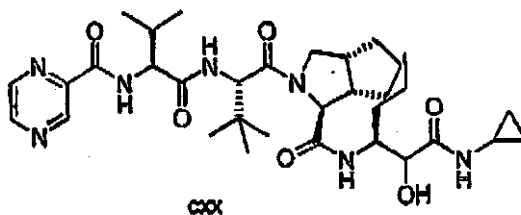
30

Ejemplo Intermedio 117 - Compuesto xxiv

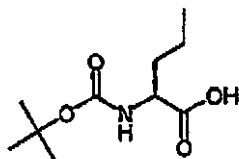
El compuesto xxiii se hidroliza usando EtOH (5 ml) y NaOH 1 N (1,5 equiv.), produciendo el compuesto xxiv (690 mg, 100%).

Ejemplo Intermedio 118 - Compuesto cxx

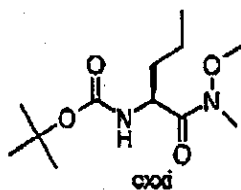
- 5 El compuesto xxiv (245 mg, 0,52 mmol) se disuelve en DCM (3 ml). A la solución se le añade PyBOP (330 mg, 0,62 mmol) y después se añade el compuesto xiii' (120 mg, 0,62 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,11 ml, 0,62 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturada y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica por cromatografía con EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto cxx (220 mg, 60%).

**Ejemplo Intermedio 119 - Compuesto xiii'**

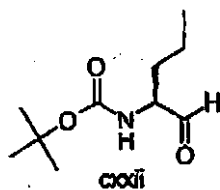
Se disuelve Boc-NVA-OH (24,96 g, 114,9 mmol) en THF (200 ml). A la solución se le añade en porciones CDI (22,35, 137,8 mmol),



- 15 y la solución se agita durante 30 minutos. Se disuelve clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (12,33 g, 126,4 mmol) en DMF (50 ml) y después a la solución se le añade DIPEA (22 ml, 126,4 mmol). La solución en DMF se deja en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se añade a la solución en THF. La mezcla resultante se agita durante un fin de semana en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentra al vacío, para dar un volumen total de 100 ml. Esta fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxi en bruto (253 g).

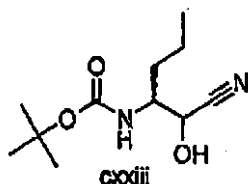


- 25 Se añade LAH (107,3 mmol) a un matraz de fondo redondo seco de 1 l en una atmósfera de N₂ en una solución 1 M de Et₂O. Esta solución se reduce hasta 0 °C, y después el compuesto cxxi (97,5 mmol) se añade gota a gota en Et₂O (100 ml). Después de que se complete la adición, la mezcla resultante se agita durante 30 minutos. La mezcla de reacción se inactiva a 0 °C añadiendo lentamente EtOAc (50 ml) seguido de la adición lenta de una solución al 5% de KHSO₄ (50 ml). Esta mezcla se agita durante 30 minutos. La fase orgánica se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxii en bruto (22,28 g).

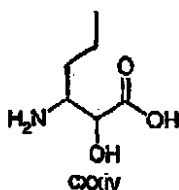


30

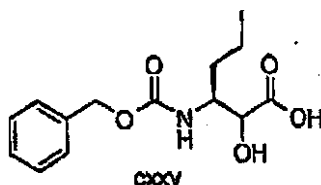
5 El compuesto cxxii se disuelve en MeOH (100 ml). Se disuelve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (16,82 g, 96,6 mmol) en agua (100 ml) y después se añade a la solución del compuesto cxxii a 0 °C. Esta mezcla se almacena en el frigorífico (5 °C) durante una noche. A la mezcla de reacción se le añade KCN (7,53 g, 115,9 mmol) en agua (100 ml) y se agita durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El compuesto se extrae con EtOAc (3 x 100 ml). La fase orgánica se lava con salmuera (3 x 50 ml), se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra, produciendo el compuesto cxxiii en bruto (15,86 g).



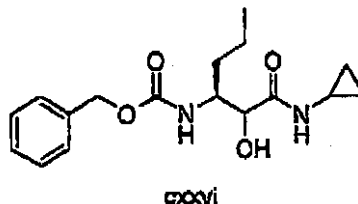
10 El compuesto cxxiii (15,86 g) se disuelve en dioxano (100 ml). A esta solución se le añade HCl concentrado (37%, 100 ml) seguido de anisol (10 ml) y se establece el reflujo (110 °C). La reacción se agita durante 1,5 horas. Cuando la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, el disolvente se retira al vacío, produciendo una pasta seca. El residuo se seca durante una noche a alto vacío, produciendo el compuesto cxxiv en bruto.



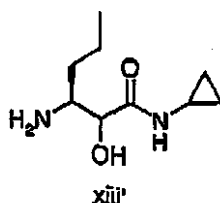
15 El compuesto cxxiv (69,6 mmol) se disuelve en DMF (60 ml) y THF (60 ml). A la mezcla se le añade N-(bencil-oxycarbonilo)succinimida (17,33 g, 69,6 mmol) seguido de la adición de DIPEA (12,1 ml, 69,6 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N_2 . La mezcla se concentra hasta un volumen reducido (50 ml) y se diluye con EtOAc. La fase orgánica se lava con HCl 0,1 N (2 x 100 ml) y salmuera, produciendo el compuesto cxxv (17,5 g, 54,2% en cinco etapas).



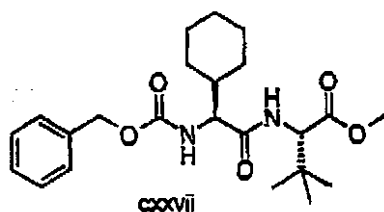
20 El compuesto cxxv (5,66 g, 20,14 mmol) se disuelve en DCM (60 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (12,57 g, 24,2 mmol) y HOBT (3,27 g, 24,2 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se reduce a 0 °C, y después se añaden ciclopropilamina (1,67 ml, 24,2 mmol) y DIPEA (4,2 ml, 24,2 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con HCl 0,1 N, NaHCO_3 saturado y salmuera. La fase orgánica después se concentra y se purifica por cromatografía usando EtOAc al 70%/Hexanos, produciendo el compuesto cxxvi (3,18 g, 49,3%).



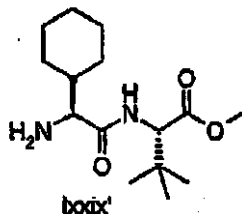
25 El compuesto cxxvi (3,18 g, 9,94 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (600 mg) en MeOH (70 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de H_2 , se filtra a través de celite y se concentra, produciendo el compuesto xiii' en bruto (2,1 g, 100%).

**Ejemplo Intermedio 120 - Compuesto cxxvii**

5 Se disuelve N-Cbz-L-ciclohexilglicina (3 g, 10,3 mmol) en DCM (36 ml). A esta solución se le añaden HOAt (1,5 g, 11,28 mmol) y DCC (11,28 ml, 11,28 mmol) y se agita durante cinco minutos. A esta mezcla se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*tert*-Leucina (103 ml, solución 1 M, 10,3 mmol) y se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite, se aclara con EtOAc y se concentra, para dar un residuo que se purifica por cromatografía usando EtOAc al 20%-30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxvii (2,2 g, 52%).

**10 Ejemplo Intermedio 121 - Compuesto lxxix'**

El compuesto cxxvii (2,2 g, 5,2 mmol) se hidrogena usando Pd(OH)₂ al 20%/C(1 g) en MeOH (15 ml) en una atmósfera de H₂, produciendo el compuesto lxxix' (1,4 g, 98%).

**Ejemplo Intermedio 122 - Compuesto lxxx**

15 Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (360 mg, 2,9 mmol) en DCM (10 ml). A la solución se le añade PyBOP (1,81 g, 3,5 mmol). Después, a la solución se le añade el compuesto lxxix' (825 mg, 2,9 mmol) en THF (10 ml) seguido de la adición de DIPEA (0,5 ml, 2,9 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. El residuo resultante de la concentración de la fase orgánica se purifica por cromatografía con EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto lxxx (780 mg, 69%).

20 Ejemplo Intermedio 123 - Compuesto lxxxi

El compuesto lxxx se hidroliza usando MeOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto lxxxi (615 mg, 81,8%).

Ejemplo Intermedio 124 - Compuesto lxxxii

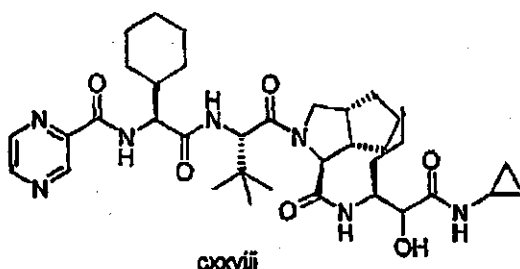
25 El compuesto lxxxi (610 mg, 1,6 mmol) se disuelve en DCM (10 ml). Después, a la solución se le añade DCC (1,94 ml, 1,94 mmol) seguido de la adición de HOAt (270 mg, 1,94 mmol). Después, a la solución se le añade el compuesto v (1,94 mmol) en THF (19,4 ml). La mezcla resultante se agita durante dos noches en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 40%/hexanos, produciendo el compuesto lxxxii (450 mg, 83,4%).

30 Ejemplo Intermedio 125 - Compuesto lxxxiii

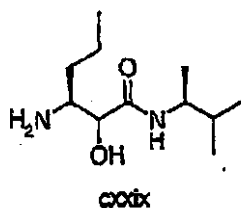
El compuesto lxxxi se hidroliza usando EtOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto lxxxiii (650 mg, 99%).

Ejemplo Intermedio 126 - Compuesto cxxviii

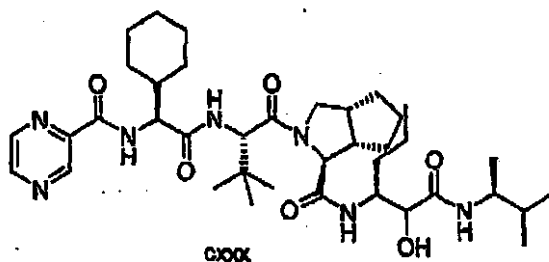
- 5 El compuesto lxxxiii (400 mg, 0,78 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (610 mg, 1,2 mmol) seguido del compuesto xiii' (230 mg, 1,2 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,2 ml, 1,2 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo se purifica por cromatografía con un gradiente de EtOAc al 100% con respecto a EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto cxxviii (365 mg, 68,7%).

**Ejemplo Intermedio 127 - Compuesto cxxx**

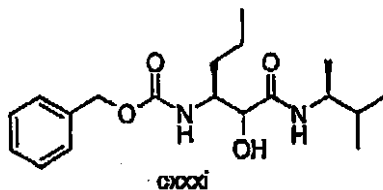
- 10 El compuesto lxxxiii (365 mg, 0,7 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (440 mg, 0,84 mmol) seguido de la adición del compuesto cxxix (0,84



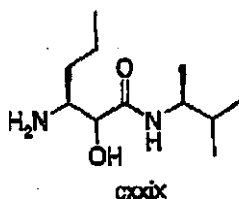
- 15 mmol) en THF (8,4 ml). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,1 ml, 0,84 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cxxx (350 mg, 70%).

**Ejemplo Intermedio 128 - Compuesto cxxxi**

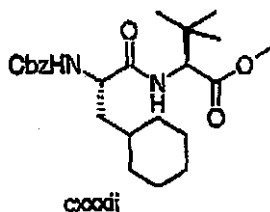
- 20 El compuesto cxxv (2,54 g, 9,05 mmol) se disuelve en DCM (30 ml). A la solución se le añaden PyBOP (5,65 g, 10,9 mmol) y HOBT (1,47 g, 10,9 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se reduce a 0 °C, después de lo cual se añaden (S)-(+)-3-Metil-2-butilamina (1,27 ml, 10,9 mmol) y DIPEA (1,9 ml, 10,9 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La fase orgánica se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxi (1,44 g, 45,5%).

**Ejemplo Intermedio 129 - Compuesto cxxix**

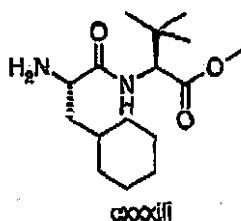
5 El compuesto cxxxi (1,3 g, 3,7 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y la fase orgánica se concentra, produciendo el compuesto cxxix en bruto (800 mg, 100%).

**Ejemplo Intermedio 130 - Compuesto cxxxiv**

El compuesto cxxxii (1,6 g, 3,7 mmol) se disuelve en MeOH (12 ml). Después del lavado abundante y minucioso

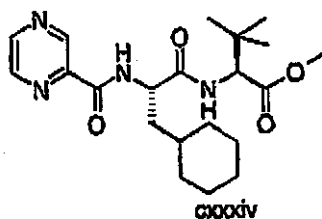


10 con X₂, se añade Pd(OH)₂ al 10% en peso sobre carbono (0,74 g) y la mezcla se hidrogena durante una noche, después de lo cual se muestra una mezcla de reacción completa por TLC (EtOAc al 30%/hexanos). La solución se aísla del material sólido por filtración y se concentra, produciendo el compuesto cxxxiii en forma de un aceite incoloro (100%) que se usa en la siguiente etapa



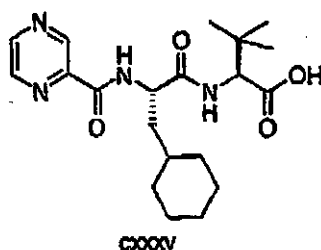
15 sin purificación adicional. Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (400 mg, 3,2 mmol 1,1 equiv.) en DCM/THF (4 ml/4 ml), y después se añaden HOAt (440 mg, 3,2 mmol) y DCC (3,3 ml, 1 M en DCM). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, el cxxxiii (0,96 g, 3,2 mmol) que se ha obtenido previamente se disuelve en DCM (6,4 ml) y se añade a la mezcla activada. Después de agitar durante 2 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra, para dar un residuo que se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexanos), produciendo el compuesto cxxxiv en forma de un sólido de color blanco (1,06 g, 83%).

20



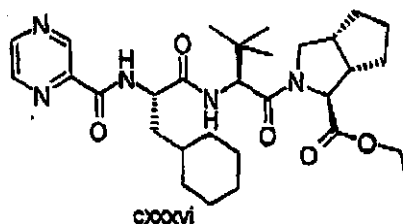
Ejemplo Intermedio 131 - Compuesto cxxxv

- 5 El compuesto cxxxiv (1,06 g, 2,6 mmol) se disuelve en MeOH (10 ml) y después se añade NaOH 2 N (ac.) (4 ml, 8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual la finalización de la hidrólisis se indica por TLC (EtOAc al 50%/hexanos). La solución se acidifica a pH 3 por HCl 5 N, se diluye con EtOAc y después se extrae la fase orgánica. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxxxv (100%) tras la concentración.



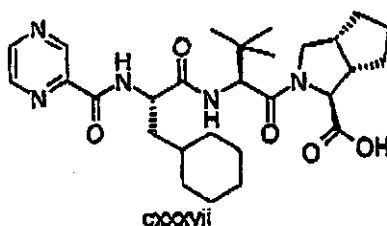
Ejemplo Intermedio 132 - Compuesto cxxxvi

- 10 A una solución en DCM (8 ml) del compuesto cxxxv (1,44 g, 3,7 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (500 mg, 3,7 mmol) y después se le añade una solución 1 M de DCC en DCM (3,7 ml, 3,7 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, al ácido activado con HOAt anterior se le añade una solución en THF (18,5 ml, 0,2 M) del compuesto v (3,7 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se diluyen con EtOAc (120 ml) y se lavan con agua y salmuera. La fase orgánica se seca y se concentra, produciendo un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 70%/hexanos), produciendo el compuesto cxxxvi (1 g, 71%).
- 15



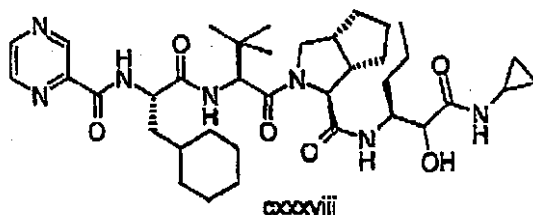
Ejemplo Intermedio 133 - Compuesto cxxxvii

- 20 A una solución en EtOH (8 ml) del compuesto cxxxvi (1 g, 1,8 mmol) se le añade una solución acuosa 2 N de NaOH (2,7 ml, 5,4 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente, después se acidifica a pH 3 con HCl 5 N, se diluye con EtOAc, y después la fase orgánica se extrae. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cxxxvii (88%) tras la concentración.

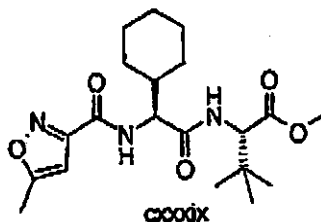


Ejemplo Intermedio 133 - Compuesto cxxxviii

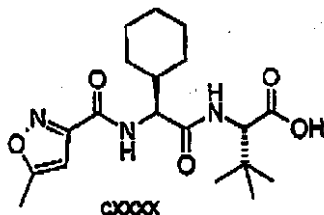
5 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto cxxxvii (350 mg, 0,6 mmol) se le añade PyBOP (450 mg, 0,86 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (160 mg, 0,86 mmol) seguido de DIPEA, (0,23 ml, 1,3 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se inactiva con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica extraída se lava con salmuera y se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, produciendo aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc) produce el compuesto cxxxviii (407 mg, 88%).

**10 Ejemplo Intermedio 134 - Compuesto cxxxix**

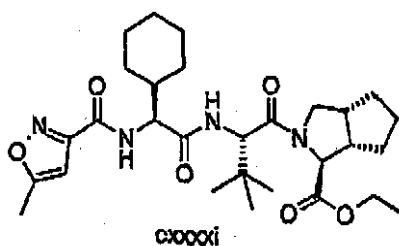
15 Se disuelve ácido 5-metiloxazol-3-carboxílico (200 mg, 2,05 mmol) en DCM (5 ml). A la solución se le añade PyBOP (1,07 g, 2,05 mmol). A la solución se le añade el compuesto lxxix' (582 mg, 2,05 mmol) en DCM (5 ml) seguido de la adición de DIPEA (0,36 ml, 2,05 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra, y el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 30%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxix (495 mg, 61,4%).

**Ejemplo Intermedio 135 - Compuesto cxxxx**

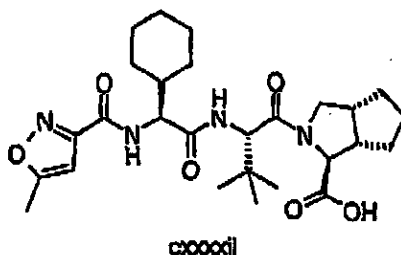
20 El compuesto cxxxix se hidroliza usando MeOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto cxxxx (430 mg, 90%).

**Ejemplo Intermedio 136 - Compuesto cxxxxi**

25 El compuesto cxxxx (380 mg, 1 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Después, a la solución se le añade DCC (1,2 mmol) seguido de la adición de HOAt (165 mg, 1,2 mmol). Después, el compuesto v (1,2 mmol) se añade en THP (12 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se filtra a través de gel de sílice y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 35%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxxi (320 mg, 58%).

**Ejemplo Intermedio 137 - Compuesto cxxxxii**

El compuesto cxxxxi se hidroliza usando EtOH (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto cxxxxii (730 mg, 94,3%).

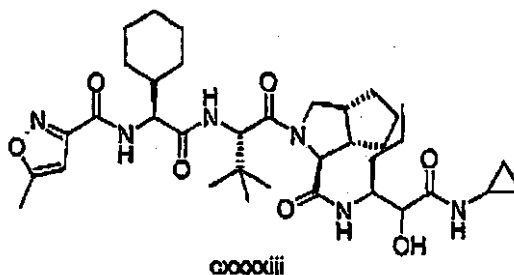


5

Ejemplo Intermedio 138 - Compuesto cxxxxiii

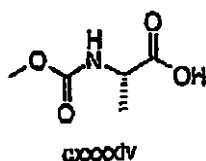
El compuesto cxxxxii (240 mg, 0,46 mmol) se disuelve en DCM (5 ml). Después, a la solución se le añade PyBOP (295 mg, 0,56 mmol) seguido de la adición del compuesto xiii' (110 mg, 0,56 mmol). A la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,1 ml, 0,56 mmol). La mezcla de reacción se agita durante dos noches en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc, y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras la concentración de la fase orgánica, el residuo resultante se purifica por cromatografía con EtOAc al 90%/hexanos, produciendo el compuesto cxxxxiii (168 mg, 53%).

10

**Ejemplo Intermedio 139 - Compuesto cxxxxiv**

15 A una solución de NaOH (2 N, 42,1 ml, 84,2 mmol) a 5 °C se le añade L-alanina (5,00 g, 56,1 mmol). Después de agitar durante 10 minutos, se añaden gota a gota de forma simultánea cloroformiato de metilo (6,5 ml, 84,2 mmol) y NaOH (2 N, 42,1 ml, 84,2 mmol). La solución se agita en un baño de hielo durante 2 horas y después a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se lava con Et₂O (2 x 50 ml), la fase acuosa se neutraliza a pH ~2 con HCl 5 N, y se extrae con EtOAc (3 x 50 ml). La fase orgánica extraída se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra, produciendo el compuesto cxxxxiv,

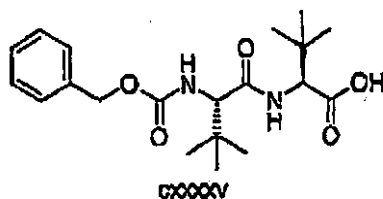
20



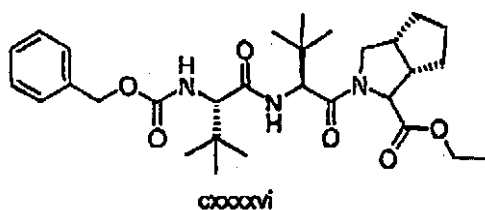
N-carbometoxi-L-alanina, (4,54 g, 54%) en forma de un aceite incoloro.

Ejemplo Intermedio 140 - Compuesto cxxxxvi

Una solución del compuesto cxxxxc (3,57 g, 9,44 mmol) en THF a 5 °C se trata con HOAt



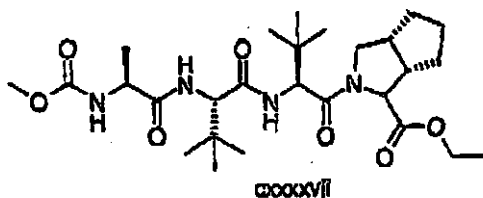
(1,28 g, 9,44 mmol) y después se añade DCC (9,50 ml, 9,50 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 5 45 minutos, se añade una solución del compuesto v (104 ml, 10,4 mmol) en THF. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se enfría a 5 °C y se inactiva con NaHCO₃ saturado. Después de la filtración para retirar el DCU precipitado, la mezcla se disuelve en EtOAc (100 ml), se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, y después se seca sobre MgSO₄ y se concentra, para dar un residuo purificado por cromatografía en columna sobre sílice (EtOAc al 25%/Hexanos), produciendo el compuesto cxxxxvi (2,91 g, 57%) en forma de una 10 espuma gomosa.

**Ejemplo Intermedio 141 - Compuesto cviii**

A una solución del compuesto cxxxxvi en MeOH (25 ml) enfriada por un baño de hielo en una corriente de N₂ se le 15 añade lentamente Pd/C. La mezcla se hidrogena a 1 atm durante una noche. El catalizador se retira por filtración, el filtrado se combina con 5 ml de DMF y se seca al vacío, produciendo el compuesto cviii.

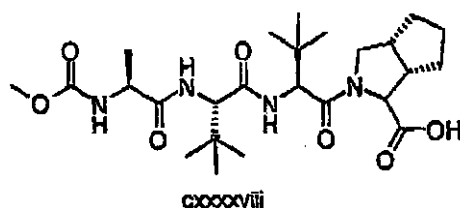
Ejemplo Intermedio 142 - Compuesto cxxxxvii

A una solución del compuesto cxxxxiv (0,298 g, 2,03 mmol) y HOAt (0,276 g, 2,03 mmol) en THF enfriado en un 20 baño de hielo se trata con DCC (2,05 ml, 2,05 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 0,5 horas, se añade una solución del compuesto cviii en THF y después se añade DIPEA (0,39 ml, 2,2 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche, después se enfría en un baño de hielo y se inactiva con NaHCO₃ saturado. El DCU precipitado se filtra, y el filtrado se disuelve en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, y después se seca sobre MgSO₄. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre sílice (EtOAc al 60%/Hexanos), produciendo el compuesto cxxxxvii (0,47 g, 48%) en forma de una espuma gomosa.



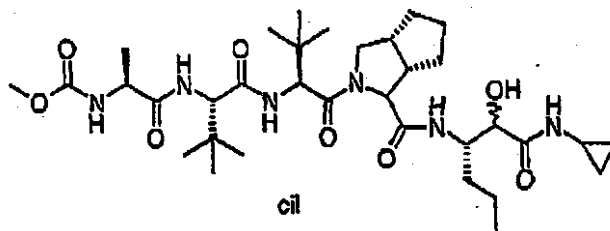
25 **Ejemplo Intermedio 143 - Compuesto cxxxxviii**

A una solución del compuesto cxxxxvii (0,47 g, 0,847 mmol) en EtOH (5 ml) a 5 °C se le añade NaOH (2 N, 1,31 ml, 2,62 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se acidifica a pH ~2 con HCl (1 N) y el EtOH se retira por evaporación rotatoria. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y el extracto combinado 30 se lava con salmuera, y después se seca sobre MgSO₄. El disolvente se retira y el residuo se seca al vacío, produciendo el compuesto cxxxxviii (0,366 g, 82%) en forma de una espuma gomosa.



Ejemplo Intermedio 144 - Compuesto cil

Una solución del compuesto cxxxviii (0,366 g, 0,718 mmol) en DCM se enfría en un baño de hielo y se trata con PyBop (0,599 g, 1,15 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 horas, la mezcla se enfría en un baño de hielo y se trata con una solución del compuesto xiii' (0,200 g, 1,08 mmol) en THF y DPEA (0,250 ml, 1,44 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se inactiva con una solución de NH₄Cl. El disolvente se concentra y la mezcla se disuelve en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, y después se seca sobre MgSO₄. Después de la eliminación del disolvente orgánico, el residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 5%/EtOAc), produciendo el compuesto cil (0,35 g, 72%)



Ejemplo Intermedio 145 - Compuesto cxxi

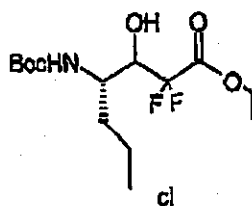
A una solución en THF (85 ml) de N-Boc-Nva-OH (compuesto 1) (8,68 g, 40 mmol) se le añade CDI (7,79 g, 48 mmol). Después de permanecer a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución anterior se trata con una solución en DMF (25 ml) que contiene clorhidrato de N,O-dimetil-hidroxilamina (4,25 g, 44 mmol) y DIPEA (7,66 ml, 44 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se concentra al vacío. El residuo resultante se diluye con EtOAc (300 ml). Esta solución se lava secuencialmente con HCl 0,1 N (50 ml), NaHCO₃ saturado (3 x 50 ml) y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos), para dar el compuesto cxxi (9,38 g, 94%).

Ejemplo Intermedio 146 - Compuesto cxxii

A una solución en dietil Et₂O (50 ml) del compuesto cxxi (9,38 g, 31,9 mmol) enfriada a 0 °C se le añade (lentamente) LAH (34,7 ml, 1 M, 34,7 mmol). La temperatura del matraz de reacción se mantiene por debajo de 5 °C durante la adición de LAH. Después de que se complete la adición, a la reacción se le añade EtOAc (20 ml) para interrumpir el exceso de LAH. Después, se añade de una forma gota a gota KHSO₄ acuoso (5%, 20 ml) con el fin de mantener la temperatura por debajo de 5 °C. La fase orgánica se separa y después se lava secuencialmente con HCl 1 N (3 x 30 ml), NaHCO₃ saturado (3 x 30 ml) y salmuera. La fase orgánica se concentra y se seca al vacío, produciendo el compuesto cxxii en bruto (5,18 g, 69%).

Ejemplo Intermedio 147 - Compuesto cl

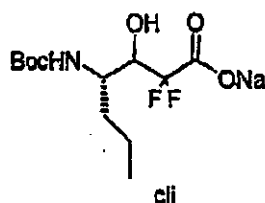
A una suspensión en THF (25 ml) de Zn (2,75 g, 42 mmol) se le añaden a reflujo 0,2 ml de EtOC(O)CF₂Br. Esto se sigue de lentamente la adición de una solución en THF (25 ml) del compuesto cxxii (3,05 g, 15,0 mmol) y EtOC(O)CF₂Br (4,84 ml, 37,5 mmol). Tras la finalización de la adición de ambos reactivos, la mezcla de reacción se calienta a reflujo adicionalmente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se diluye con DCM (200 ml). La fase orgánica se lava con KHSO₄ 1 N. La fase orgánica se concentra y se seca al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/Hexano), produciendo el compuesto cl (2,78 g, 57%).



Esta preparación es básicamente la misma que la desvelada por Thaisrivongs y col., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986).

Ejemplo Intermedio 148 - Compuesto cli

- 5 Una solución en THF (40 ml) del compuesto cli (2,78 g, 8,53 mmol) se trata con NaOH 1 N (128 ml, 12,8 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, el disolvente se elimina parcialmente al vacío. La mezcla de reacción restante se diluye con agua (50 ml) y se liofiliza, produciendo el compuesto cli en bruto (2,82 g, >100%) en forma de su sal sódica.

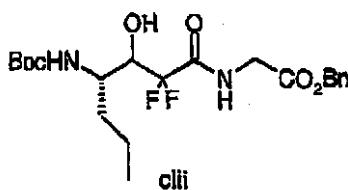


- 10 Esta preparación es básicamente la misma que la desvelada por Thaisrivongs y col., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986).

Ejemplo Intermedio 149 - Compuesto clii

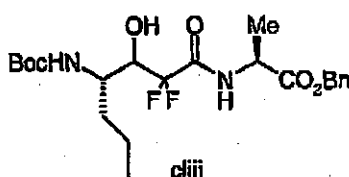
- 15 Una solución en DCM (10 ml) del compuesto en bruto cli (516 mg, 1,61 mmol) con HOBt (436 mg, 3,23 mmol) y DIC (0,328 ml, 2,09 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en DCM (5 ml) que contiene éster bencílico de glicina-sal TsOH (815 mg, 2,42 mmol) y DIPEA (0,422 ml., 2,42 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, la mezcla de reacción se inactiva con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica se seca, se concentra al vacío y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/hexanos), produciendo el compuesto clii (495 mg, 69%).

- 20 RMN ¹H del compuesto clii (400 MHz, CDCl₃): δ 7,29-7,21 (m, 5H), 5,16 (s a, 2H), 4,89 (s a, 1H), 4,20-3,90 (m, 4H), 3,80 (s a, 1H), 1,75-1,42 (m, 4H), 1,38 (s, 9H), 0,87 (m, 3H).

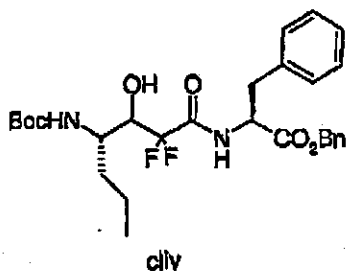


Partiendo del compuesto cli en bruto, los compuestos cliii (83%) y cliiv (50%) se preparan en un procedimiento idéntico al que se ha descrito para el compuesto clii.

- 25 RMN ¹H del compuesto cliii (400 MHz, CDCl₃): δ 7,49 (s a, 1H), 7,34-7,24 (m, 5H), 5,13 (AB c, J = 12,2 Hz, J' = 23,9 Hz, 2H), 4,88 (d a, J = 8,8 Hz, 1H), 4,53 (m, 1H), 3,98-3,91 (m, 2H), 3,82 (m, 1H), 1,65-1,20 [m, 16H, incluyendo singlete en 1,37 (9H)], 0,86 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

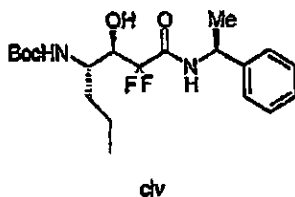


RMN ^1H del compuesto cliv (400 MHz, CDCl_3): δ 7,60-7,0 (m, 10H), 5,30-5,00 (m, 2H), 5,00-4,75 (m, 2H), 4,15-3,70 (m, 3H), 3,30-3,00 (m, 2H), 1,75-1,20 (m, 13H, incluyendo singlete en 1,36 (9H)), 0,86 (s a, 3H).



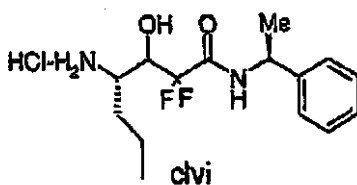
Ejemplo Intermedio 150 - Compuesto clv

- 5 A una solución en DCM (10 ml) y THF (5 ml) del compuesto cli en bruto (1 g, 3,13 mmol) se le añaden HOBT (634 mg, 4,69 mmol) y EDCI (781 mg, 4,07 mmol) y después (s)- α -metilbencilamina (0,604 ml, 4,69 mmol). La mezcla de reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente y después se inactiva con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se seca sobre Na_2SO_4 . La fase orgánica se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/hexanos),
- 10 produciendo el compuesto clv (459 mg, 37%). RMN ^1H del compuesto clv (400 MHz, CDCl_3): δ 7,32-7,21 (m, 6H), 5,00 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,94 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 1,65-1,15 [m, 16H, incluyendo doblete en 1,51 (J = 6,8 Hz, 3H), singlete en 1,39 (9H)], 0,82 (m, 3H).

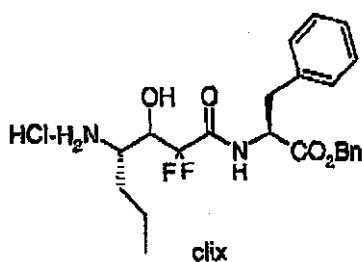
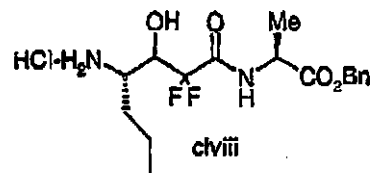
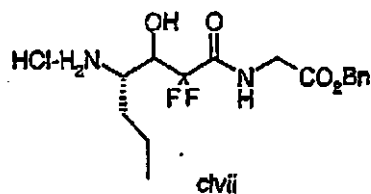


Ejemplo Intermedio 151 - Compuesto clvi

- 15 El compuesto clv (220 mg, 0,55 mmol) se disuelve en HCl 4 N en dioxano (10 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y después se concentra al vacío, para dar el compuesto clvi en bruto (~100%) en forma de su sal HCl.

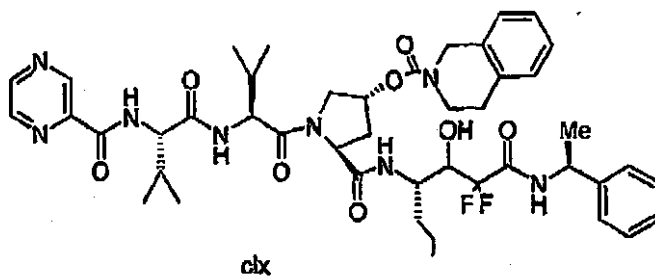


- 20 Siguiendo el procedimiento que se ha descrito para preparar el compuesto clvi, los compuestos clvii, clviii y clix se preparan casi con un rendimiento cuantitativo a partir del compuesto cli en bruto.



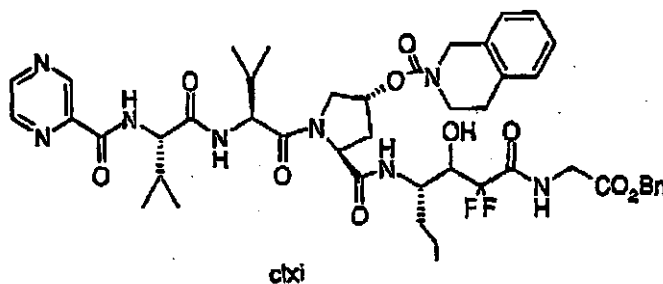
Ejemplo Intermedio 152 - Compuesto clx

5 Una solución en DCM (4 ml) de la sal HCl del compuesto vii (96 mg, 0,144 mmol) se trata con PyBOP (120 mg, 0,23 mmol) y DIPEA (0,1 ml, 0,576 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución se trata con una solución en THF (4 ml) que contiene el compuesto clv (0,288 mmol) y DIPEA (0,2 ml, 1,152 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc (50 ml), y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80%/hexanos), produciendo el compuesto clx (113 mg, 89%).



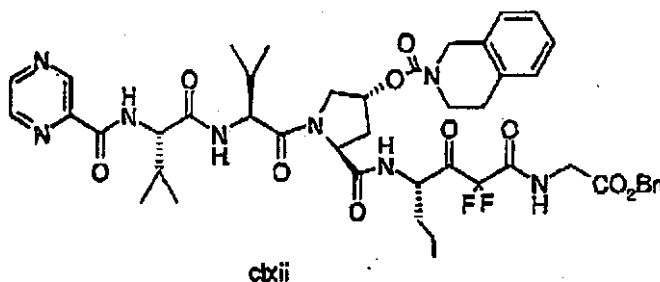
Ejemplo Intermedio 153 - Compuesto clxi

15 Una solución en DCM (6 ml) del compuesto vii (140 mg, 0,235 mmol) se trata con PyBOP (196 mg, 0,376 mmol) durante 30 minutos. Después, a la solución anterior se le añade una solución en THF (6 ml) del compuesto cviii (~0,47 mmol) y DIPEA (0,327 ml, 1,88 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y se inactiva con agua (30 minutos). La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (50 ml). La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. Las fases acuosas combinadas se extraen de nuevo con EtOAc (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80-100%/hexanos), produciendo el compuesto clxi (104 mg, 48%).



Ejemplo Intermedio 154 - Compuesto cxix

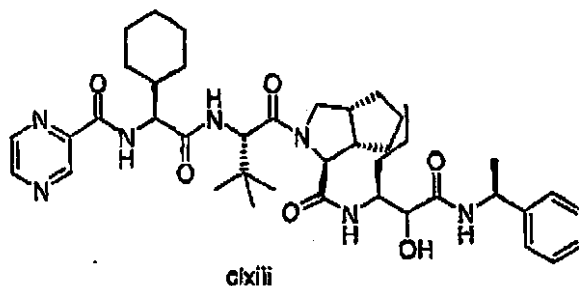
5 A una solución en DCM (10 ml) del compuesto cxix (280 mg, 0,304 mmol) se le añade el reactivo de DMP (193 mg, 0,456 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se inactiva con Na₂SO₃ al 10%. La fase orgánica se lava con NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica resultante se seca y se concentra al vacío, produciendo un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 80-100%/hexanos), produciendo el compuesto cxixii (271 mg, 97%).



Ejemplo Intermedio 155 - Compuesto cxixiii

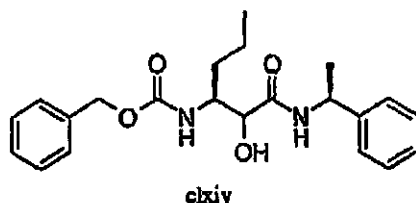
10 El compuesto lxxxiii (220 mg, 0,43 mmol) se recoge en DCM (5 ml). A la solución en DCM se le añade PyBOP (270 mg, 0,51 mmol) y se agita durante 5 minutos. A esta solución se le añade gota a gota el compuesto xxxvi' (0,51 mmol) en THF (5,1 ml). A la mezcla de reacción se le añade DIPEA (0,09 ml, 0,51 mmol) y se agita durante una noche en una atmósfera de N₂. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado y se lava con salmuera. La purificación con un gradiente de EtOAc del 70% al 90%/Hexano produce el compuesto cxixiii (180 mg, 56%).

15



Ejemplo Intermedio 156 - Compuesto cxixiv

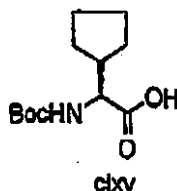
20 El compuesto cxxv (2,09 g, 7,4 mmol) se recoge DCM (20 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (4,64 g, 8,9 mmol) y HOBt (1-2 g, 8,9 mmol) y se agita durante cinco minutos. La mezcla resultante se reduce a 0 °C, en la que se añaden S(-)-α-Metil-bencilamina (1,15 ml, 8,9 mmol) y DIPEA (1,55 ml, 8,9 mmol). La reacción se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ sat. y salmuera. La purificación con EtOAc al 30%/Hexanos produce el compuesto cxixiv (1,6 g, 56,3%).

**Ejemplo Intermedio 157 - Compuesto xxxvi'**

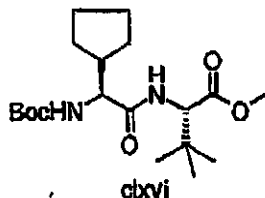
5 El compuesto clxiv (1,48 g, 3,8 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (300 mg) en MeOH (50 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y se concentra, para dar el compuesto xxxvi' (895 mg, 94,2%).

Ejemplo Intermedio 158 - Compuesto clxvi:

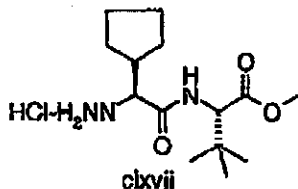
A una solución en DCM (15 ml) del compuesto clxiv (2 g, 8,2 mmol) se le añaden HOAt (1,34 g,



10 9,84 mmol) y DCC (9,84 ml, 1 M, 9,84 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la solución anterior se le añade una solución en THF (9,84 ml) que contiene éster metílico de *tert*-L-Leucina-clorhidrato (9,84 mmol) y DIPEA (1,72 ml, 9,84 mmol). Después, se añade DMAP (1 g, 8,2 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Tras el tratamiento acuoso convencional y la cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 20%/Hexanos) se obtiene el compuesto clxvi (1,75 g, 58%).

**15 Ejemplo Intermedio 159 - Compuesto clxvii:**

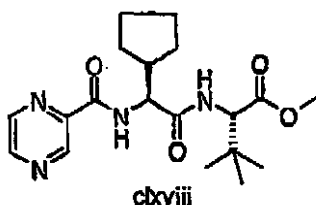
A una solución en THF (35 ml) del compuesto clxvii (1,75 g, 4,73 mmol) se le añade una solución 4 N de HCl en dioxano (11,8 ml, 47,3 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. En este momento, el disolvente se retira a presión reducida, produciendo clxvii en bruto (~100%), que se disuelve de nuevo en DMF y se usa directamente en la siguiente reacción.



20

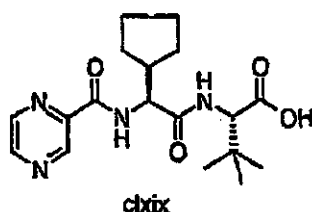
Ejemplo Intermedio 160 - Compuesto clxviii:

25 A una solución en DCM (15 ml) que contiene ácido 2-pirazinacarboxílico (447 mg, 3,6 mmol) y PyBOP (1,87 g, 3,6 mmol) se le añade una solución en DMF (15 ml) del compuesto clxviii (811 mg, 3 mmol). Después, a la mezcla resultante se le añade DIPEA (0,63 ml, 3,6 mmol). La reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente y después se interrumpe con agua. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc. La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 40%/Hexanos), produciendo el compuesto clxviii (0,93 g, 82%).



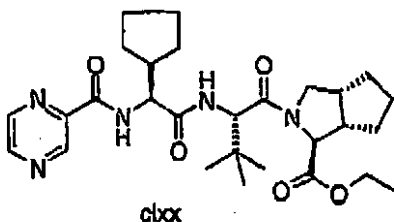
Ejemplo Intermedio 161 - Compuesto clxix:

5 A una solución en MeOH (10 ml) del compuesto clxviii (0,93 g, 2,47 mmol) se le añade NaOH 2 N (3,71 ml, 7,41 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se acidifica a pH 3 usando HCl 1 N. La reacción se diluye con EtOAc (75 ml), y se lava con agua y salmuera. La fase orgánica obtenida de esta manera se seca y se concentra al vacío, para dar el compuesto clxix (~100%).



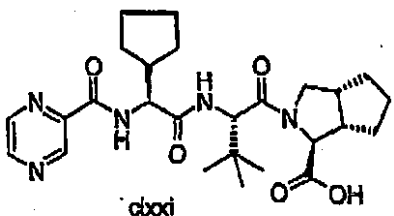
Ejemplo Intermedio 162 - Compuesto clxx:

10 Una solución en DCM (10 ml) del compuesto clxix (2,47 mmol) se trata con HOAt (436 mg, 3,21 mmol) y DCC (3,2 ml, 1 M, 3,2 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (13,6 ml) del compuesto v (499 mg, 2,72 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, se filtran sólidos de color blanco (urea). Los filtrados se concentran al vacío, para dar un residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, produciendo el compuesto clxx (0,99 g, 76%).



15 **Ejemplo Intermedio 163 - Compuesto clxxi:**

Una solución en EtOH (20 ml) del compuesto clxx (0,99 g, 1,88 mmol) se trata con NaOH 2 N (2,81 ml, 5,63 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se acidifica a pH 3 con HCl 1 N. La mezcla de reacción se extrae con EtOAc (75 ml). La fase orgánica se seca y se concentra al vacío, para dar el compuesto clxxi (772 mg, 82%).

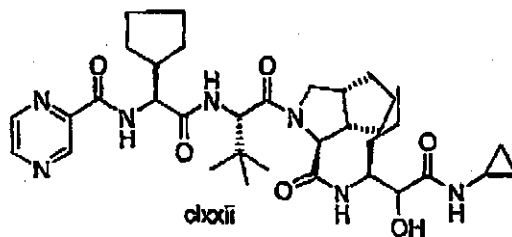


20

Ejemplo Intermedio 164 - Compuesto clxxi:

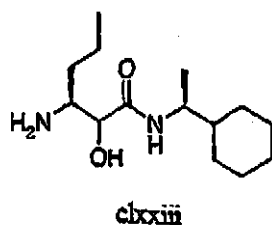
25 Una solución en DCM (10 ml) del compuesto clxxi (290 mg, 0,58 mmol) se trata con PyBOP (484 mg, 0,93 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de reacción se trata con una solución en THF (7,5 ml) del compuesto xiii' (140 mg, 0,75 mmol) seguido de DIPEA (0,13 ml, 0,75 mmol). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la reacción se interrumpe con agua y se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera, se seca y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica por

cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 5%/EtOAc), produciendo el compuesto clxxii 290 mg (75%).

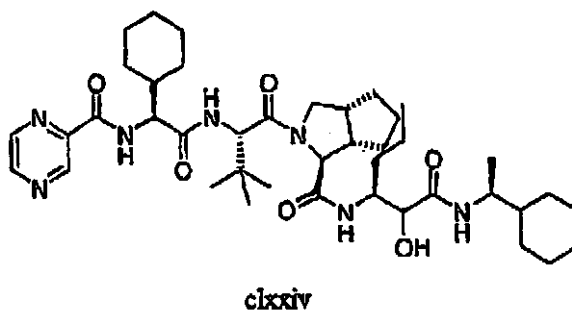


Ejemplo Intermedio 165 - Compuesto clxxiv:

5 El compuesto lxxxiii (600 mg, 1,17 mmol) se recoge en DCM (4 ml). Se añade PyBOP (670 mg, 1,3 mmol), se agita durante cinco minutos y se enfría a 0 °C. A esta solución se le añade gota a gota el compuesto clxxiii (333 mg, 1,3 mmol)

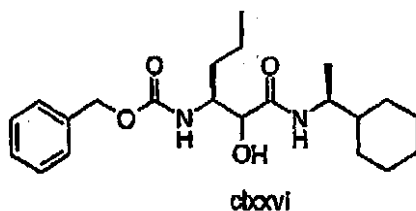


10 en THF (13 ml). A la mezcla de reacción se le añade DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol) y se deja calentar a temperatura ambiente con agitación durante dos noches. Al día siguiente, la reacción se concentra y se purifica con EtOH al 2%/EtOAc, para dar el compuesto clxxiv en bruto (900 mg, exceso del 100%).



Ejemplo Intermedio 166 - Compuesto clxxxv:

15 El compuesto cxxv (3,01 g, 10,7 mmol) se recoge en DCM (30 ml) y la temperatura se reduce a 78 °C. A esta solución se le añaden PyBOP (6,1 g, 11,7 mmol) y HOBT (1,58 g, 11,7 mmol) seguido de (S)-(+)-1-ciclohexiletilamina, el compuesto clxxv, (1,74 ml, 11,7 mmol) y DIPEA (2,1 ml, 11,7 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con HCl 0,1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. El producto se purifica con EtOAc al 40%/Hex, para dar 2 g (47,8%) del compuesto clxxvi.



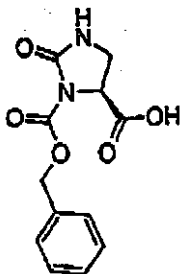
20 Ejemplo Intermedio 167 - Compuesto clxxiii:

El compuesto clxxvi (2 g, 5,13 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y se

concentra, para dar el compuesto clxxiii (1,31 g, 99,8%).

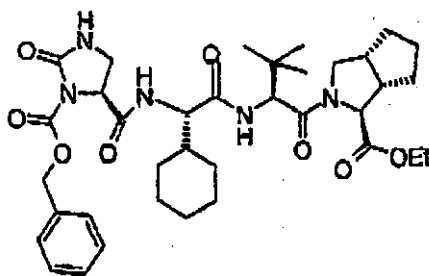
Ejemplo Intermedio 168 - Compuesto clxxix:

En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve el compuesto clxxvii [1-bencilo éster del ácido (S)-(-)-2-oxo-1,5-imidazolina dicarboxílico] (290 mg, 1,1 mmol)



clxxvii

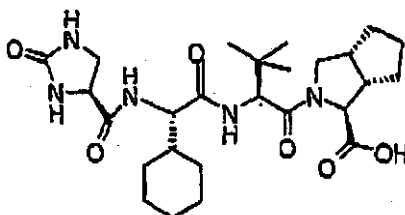
5 en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (151 mg, 1,2 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmol) seguido de la adición del compuesto clxxviii (1 mmol, 435 mg.) en DMF anhidra (4 ml). La reacción se deja aclarar lentamente a temperatura ambiente y se agita durante 2 días. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava dos veces con HCl 1 N (50 ml) y una vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM y eluido con EtOAc al 30% después al 50%/DCM y después MeOH al 2%/EtOAc), produciendo el producto clxxix (434 mg, 64%).



clxxix

15 **Ejemplo Intermedio 169 - Compuesto clxxx:**

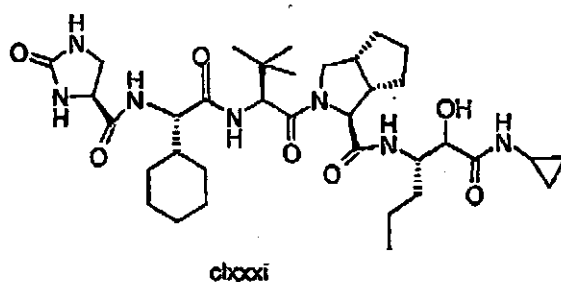
El material de partida clxxix (434 mg, 0,64 mmol) se disuelve en Dioxano (6 ml) y una solución acuosa 0,5 M de NaOH (4 ml, 3 equiv.). La reacción se realiza durante una noche. El análisis por TLC en EtOAc al 100% (usando tinción PMA) muestra además del producto de ácido esperado del principio, un producto de realización más rápida. La mezcla de reacción se acidifica a pH 2 con HCl 1 N, y después se extrae dos veces con EtOAc. A la solución acuosa se le añade NaCl sólido para facilitar la extracción. Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO₄ y se evaporan a presión reducida. La EM indica que el grupo CBZ se retira por la hidrólisis. El compuesto resultante clxxx (rendimiento cuantitativo) se usa tal cual en la siguiente etapa.



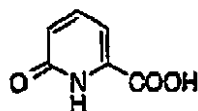
clxxx

Ejemplo Intermedio 170 - Compuesto clxxx:

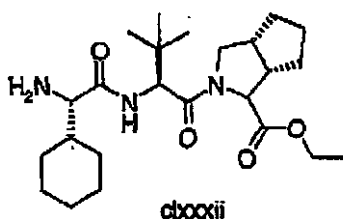
En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve el compuesto clxxx (279 mg, 0,54 mmol) en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (82 mg, 0,65 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,11 ml, 0,65 mmol) seguido de la adición del compuesto xiii' (0,7 mmol) en DMF anhidra (4 ml). La reacción se deja aclarar lentamente a temperatura ambiente y se agita durante 21 horas. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava dos veces con HCl 1 N (50 ml) y una vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se limpia por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM y eluido con EtOAc al 50%/Hexano, después MeOH al 3%/EtOAc, y después EtOH al 20%/EtOAc). Después de la eliminación del disolvente, el residuo se disuelve de nuevo en Dri Solv THF y se filtra para retirar cualquier cantidad residual de gel de sílice. Después, la retirada del disolvente produce el compuesto clxxx (434 mg, rendimiento del 64%).

**Ejemplo Intermedio 171 - Compuesto clxxxiii:**

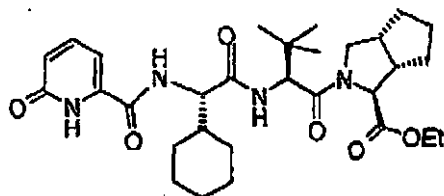
En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve 6-hidroxi picolínico



(153 mg, 1,1 mmol) en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (151 mg, 1,2 mmol) y después la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,2 ml, 0,16 g, 1,2 mmol) seguido de la adición del compuesto clxxxii (1,0 mmol, 435 mg) en DMF anhidra (4 ml).

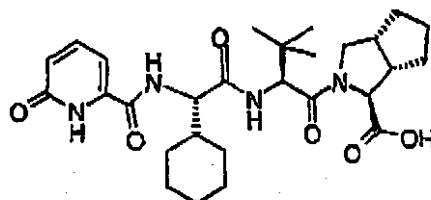


La reacción se deja aclarar lentamente a temperatura ambiente y se agita durante 2 días. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene 120 ml de EtOAc y se lava dos veces con HCl 1 N (50 ml) y una vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM, eluido con 30%, después EtOAc al 50%/DCM, y después MeOH al 2%/EtOAc), produciendo el compuesto clxxxiii recogido (314 mg 56%).



Ejemplo Intermedio 172 - Compuesto clxxxiv:

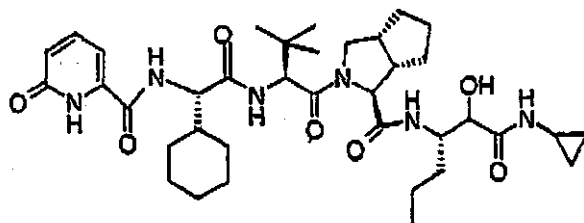
- El material de partida clxxxiii (314 mg, 0,56 mmol) se disuelve en dioxano (5 ml) y NaOH 0,5 M (3,4 ml, 3 equiv.). La reacción se realiza durante una noche. El análisis por TLC en EtOAc al 100% (usando UV) muestra una conversión completa en el producto ácido de realización lenta del principio. La reacción se acidifica a pH 2 con HCl 1 N y después se extrae dos veces con EtOAc. Al producto acuoso se le añade NaCl sólido para facilitar la extracción. Después, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO₄ y después se evaporan a presión reducida, produciendo el compuesto clxxxiv (0,5 mmol, 89%) que se usa tal cual en la siguiente etapa.



clxxxiv

Ejemplo Intermedio 173 - Compuesto clxxxv:

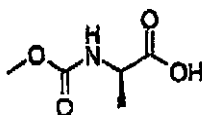
- En un matraz de fondo redondo en una atmósfera inerte, se disuelve el compuesto ácido clxxxiv (265 mg, 0,5 mmol) en DMF anhidra (6 ml). Se añade HOAt (75,6 mg, 0,6 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después, la reacción se enfría en un baño de hielo. Después, se añade DIC (0,1 ml, 0,6 mmol) seguido de la adición del compuesto xiii' (0,65 mmol) en DMF anhidra (4 ml). La reacción se deja aclarar lentamente a temperatura ambiente y se agita durante 21 horas. Después, la reacción se vierte en un embudo de decantación que contiene EtOAc (120 ml) y se lava dos veces con HCl 1 N (50 ml) y una vez con salmuera. La fase orgánica se separa y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (cargado en DCM, eluido con EtOAc al 50%/Hexano, después EtOAc puro, y después MeOH al 4%/EtOAc), produciendo el compuesto del producto clxxxv (185 mg, 52%).



clxxxv

Ejemplo Intermedio 174 - Compuesto cxxxxiv':

- A una solución de D-alanina (5 g, 56,1 mmol) en NaOH 1 N (152 ml, 152 mmol) a 0 °C se le añade una solución de MeOC(O)Cl (6,5 ml, 84,2 mmol) en éter dietílico (30 ml). La mezcla se agita en un baño de hielo durante 3 horas y después se ajusta a pH 9 con NaOH 1 N. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla se lava con éter (3 x 50 ml), se acidifica a pH -2 con HCl 5 N y se extrae con EtOAc (5 x 50 ml). El extracto orgánico se lava con agua y salmuera y después se seca (MgSO₄). El disolvente se retira, produciendo el compuesto cxxxxiv', N-metoxicarbonil-D-alanina, en forma de un aceite incoloro (6,48 g, 79%).

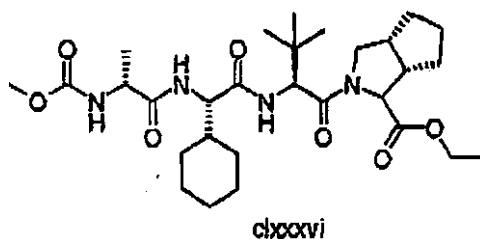


cxxxxiv'

Ejemplo Intermedio 175 - Compuesto clxxxvi:

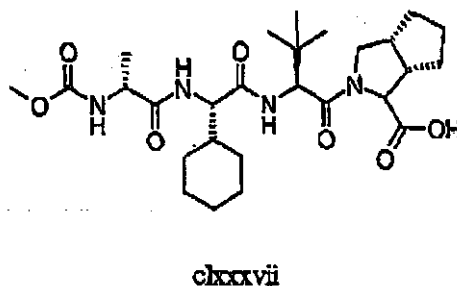
- Una solución de N-metoxicarbonil-D-alanina (0,193 g, 1,31 mmol) y HOAt (0,177 g, 1,31 mmol) en DCM (10 ml) enfriada en un baño de hielo se trata con DCC (1,31 ml, 1,31 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 0,5 horas, se añade una solución del compuesto clxxxii preparado (0,88 mmol) en THF (8,8 ml). La mezcla se calienta hasta la temperatura ambiente, se agita durante una noche, después se enfría en un baño de hielo y se inactiva con una solución saturada de NaHCO₃. Los precipitados se filtran y el filtrado se recoge en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera, y después se seca (MgSO₄). Después

de la retirada del disolvente, el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre sílice (EtOAc al 60%/Hexano), produciendo el compuesto clxxxvi en forma de una espuma gomosa (0,321 g, 68%).



Ejemplo Intermedio 176 - Compuesto clxxxvii:

- 5 A una solución del compuesto clxxxvi (0,321 g, 0,597 mmol) en EtOH (5 ml) a 5 °C se le añade NaOH 2 N (1,05 ml, 2,1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se acidifica a pH -2 con HCl 1 N y el EtOH se retira por evaporación rotatoria. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y el extracto combinado se lava con salmuera y después se seca (MgSO₄). El disolvente se retira y el residuo se seca al vacío, para dar el compuesto clxxxvii en forma de una espuma gomosa (0,235 g, 77%).



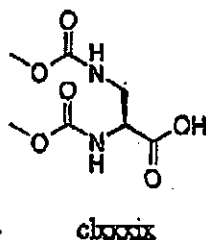
10

Ejemplo Intermedio 177 - Compuesto clxxxviii:

- 15 Una solución del compuesto clxxxvii (0,363 g, 0,712 mmol) en DCM (10 ml) se enfría en un baño de hielo y se trata con PyBOP (0,594 g, 1,14 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 horas, la mezcla se enfría en un baño de hielo y se trata con una solución del compuesto xiii' (1,1 mmol) en THF (11 ml) y DIPEA (0,249 ml, 1,42 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche y se inactiva con una solución en NH₄Cl. El disolvente se concentra y la mezcla se recoge en EtOAc (100 ml). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera, y después se seca (MgSO₄). Después de la retirada del disolvente, el residuo se purifica por cromatografía en columna (EtOH al 5%/EtOAc), para dar clxxxviii (0,341 g, 71%).

Ejemplo Intermedio 178 - Compuesto clxxxix:

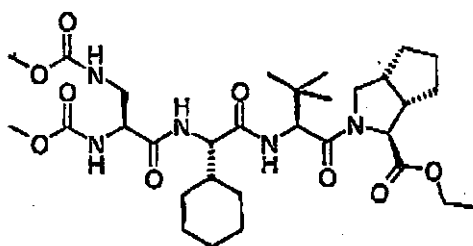
- 20 Se recoge ácido diaminopropiónico (3 g, 28,7 mmol) en NaOH 1 M (86,2 ml, 86,2 mmol) y se enfría a 0 °C, y después se añade MeOC(O)Cl (5,54 ml, 71,75 mmol) en Et₂O (25 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche con calentamiento a temperatura ambiente. El pH de la mezcla de reacción se disminuye a 2 y la fase acuosa se extrae tres veces con EtOAc. Los extractos se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran, produciendo el compuesto clxxxix (3,09 g, 48,9%).



25

Ejemplo Intermedio 179 - Compuesto cc:

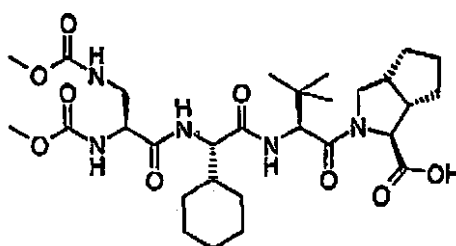
- 30 El compuesto clxxxix (340 mg, 1,55 mmol) se recoge en DCM (4 ml). Se añaden DCC (1,7 mmol) y HOAt (235 mg, 1,7 mmol) seguido del compuesto clxxxii (1,7 mmol) en DCM (3,4 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una capa de sílice y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 75%/Hex, para dar el compuesto clxxxx (71,5 mg, 72,4%).



clxxxx

Ejemplo Intermedio 180 - Compuesto clxxxxi:

El compuesto clxxxx (715 mg, 1,12 mmol) se hidroliza en condiciones convencionales usando EtOH (4 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.), produciendo el compuesto clxxxxi (600 mg, 88,0%).



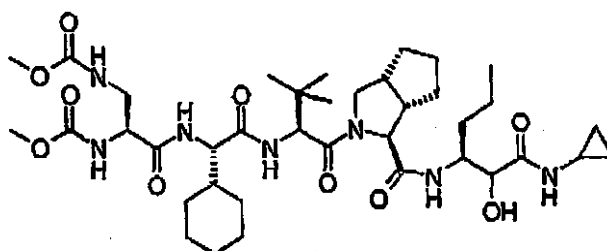
clxxxxi

5

Ejemplo Intermedio 181 - Compuesto clxxxxii:

El compuesto clxxxxi (550 mg, 0,9 mmol) se recoge en DCM (8 ml). Se añade PyBOP (675 mg, 13 mmol) seguido del compuesto xiii' (1,3 mmol) en THF (1,3 ml). Se añade DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol) y la solución resultante se agita durante una noche. Al día siguiente, la reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado, y después con salmuera, antes de concentrarse, produciendo un residuo. El residuo resultante se purifica por EtOH al 5%/EtOAc, produciendo el compuesto clxxxxii (290 mg, 41,5%).

10

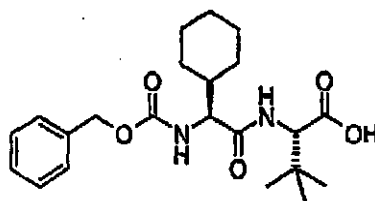


clxxxxii

Ejemplo Intermedio 182 - Compuesto clxxxxiii:

Se hidroliza éster metílico de Cbz-ciclohexiglicina-*terc*-leucina (736 g, 17,6 mmol) en condiciones convencionales usando MeOH (60 ml) y NaOH 1 N (52,8 ml, 3 equiv.), produciendo el intermedio clxxxxiii (92%).

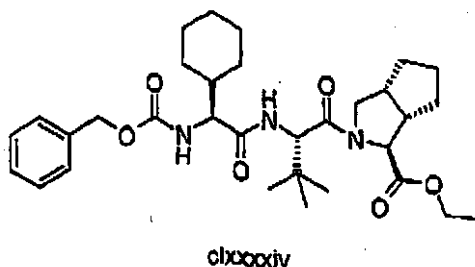
15



clxxxxiii

Ejemplo Intermedio 183 - Compuesto clxxxiv:

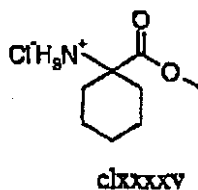
- 5 El compuesto clxxxiii (3,82 g, 9,46 mmol) se recoge en DCM (30 ml). Se añade DCC (11,35 mmol) en DCM (11,35 ml) seguido de la adición de HOAt (1,54 g, 11,35 mmol). La mezcla resultante se agita durante cinco minutos y se añade el compuesto v (9,46 mmol) en THF (40 ml). La mezcla resultante se agita durante una noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y después con salmuera, antes de concentrarse, produciendo un residuo. El residuo resultante se purifica con un gradiente del 20% al 30% sobre gel de sílice, para dar el compuesto clxxxiv (3,03 g, 56,3%).

**Ejemplo Intermedio 183 - Compuesto clxxxii:**

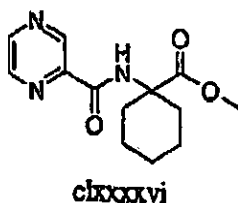
- 10 El compuesto clxxxiv (3,03 g, 5,33 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (30 ml) en una atmósfera de H₂ durante 4 horas, produciendo el compuesto clxxxii (2,3 g, 99%).

Ejemplo Intermedio 184 - Compuesto clxxxv:

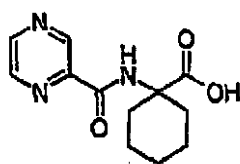
- 15 A una solución de ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico (2,86 g, 20 mmol) en MeOH (40 ml) se le añade gota a gota SOCl₂ (3 ml) a 0 °C. La mezcla se calienta lentamente hasta la temperatura ambiente y después se calienta a reflujo durante 5 horas. Después, a la solución transparente se le añade Et₂O y el precipitado se aísla. El sólido se seca adicionalmente sobre vacío, produciendo el compuesto clxxxv (95%) en forma de un polvo de color blanco.

**Ejemplo Intermedio 185 - Compuesto clxxxvi:**

- 20 Se disuelve ácido 2-pirazinacarboxílico (1 g, 8 mmol, 1 equiv.) en DCM (15 ml) con la adición de HOAt (1,1 g, 8 mmol) y DCC (8 ml, 1 M) en DCM. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la mezcla activada se le añade el compuesto clxxxv (1,3 g, 8 mmol). Se añade posteriormente DIPEA (2 ml, 12 mmol) seguido de DMAP (1,5 g, 12 mmol). Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de celite, se concentra, y el producto deseado clxxxvi se purifica por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano) en forma de un aceite de color amarillo (2,1 g, 100%).

**Ejemplo Intermedio 186 - Compuesto clxxxvii:**

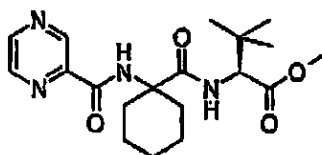
- 30 El compuesto clxxxvi (1,06 g, 2,6 mmol) se disuelve en MeOH (30 ml) con la adición de NaOH 2 N (ac.) (12 ml, 24 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche antes de que el análisis por TLC (EtOAc al 50%/hexano) indique la hidrólisis completa. Después, la solución se acidifica a pH 3 con HCl 5 N y se diluye con BtOAc seguido de la extracción de la fase orgánica. La fase orgánica se lava posteriormente con salmuera y se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto clxxxvii (84%) tras la concentración.



clxxxvii

Ejemplo Intermedio 187 - Compuesto clxxxviii:

El compuesto clxxxvii (1,6 g, 6,4 mmol) se disuelve en DCM (18 ml) y después se añaden posteriormente HOAt (0,96 g, 7 mmol) y DCC (7 ml, 1 M en DCM) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la mezcla activada se le añade clorhidrato de éster metílico de L-*tert*-leucina (7 ml, 1 M en THF). Posteriormente se añade DIPEA (1,2 ml, 7 mmol) seguido de DMAP (1,2 g, 9,8 mmol). Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de celite, se purifica por cromatografía en columna y se concentra, produciendo el compuesto clxxxviii (60% EtOAc/hexano) en forma de un sólido de color blanco (1,74 g, 72%).



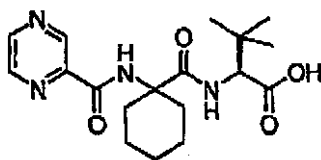
clxxxviii

10

Ejemplo Intermedio 188 - Compuesto cic:

El compuesto clxxxviii (1,74 g, 4,6 mmol) se disuelve en MeOH (22 ml) con la adición de NaOH 2 N (ac.) (7 ml, 14 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante una noche antes de que el análisis por TLC (EtOAc al 50%/hexano) indique la hidrólisis completa. La solución se acidifica a pH 3 por HCl 5 N y se diluye con EtOAc, y después la fase orgánica se extrae. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y después se concentra, produciendo el compuesto cic (100%).

15

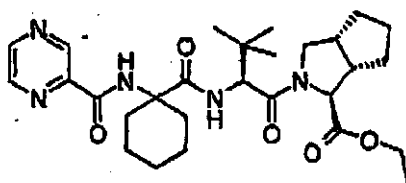


cic

Ejemplo Intermedio 189 - Compuesto cc

A una solución en DCM (15 ml) del compuesto cic (1,5 g, 4,1 mmol) a temperatura ambiente se le añade HOAt (610 mg, 4,5 mmol) seguido de una solución 1 M de DCC en DCM (4,5 ml, 4,5 mmol). Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añade una solución en THF (20 ml, 0,2 M) del compuesto v (4 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se filtra a través de celite. El filtrado se concentra, para dar un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50%/hexano), produciendo el compuesto cci (660 mg, 32%).

20

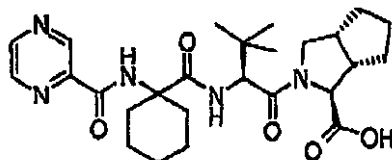


cc

25

Ejemplo Intermedio 190 - Compuesto cci:

5 A una solución en EtOH (6 ml) del compuesto cc (600 mg, 1,13 mmol) se le añade NaOH 2 N (1,7 ml, 3,4 mmol). La reacción se agita durante 2 horas a temperatura ambiente y después se acidifica a pH 3 con HCl 5 N. Después, la mezcla se diluye con EtOAc seguido de la extracción de la fase orgánica. Posteriormente, la fase orgánica se lava con salmuera y después se seca sobre MgSO₄, produciendo el compuesto cci (92%) tras la concentración.

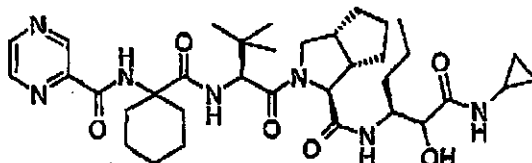


cci

Ejemplo Intermedio 191 - Compuesto ccii:

10 A una solución en DCM (8 ml) de ccii (310 mg, 0,62 mmol) se le añade PyBOP (420 mg, 0,8 mmol). La solución se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, a esta solución se le añade el compuesto xiii' (8 ml, 0,1 M) en THF seguido de la adición de DIPEA (0,23 ml, 1,3 mmol).

La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y después se interrumpe con agua (25 ml) durante 30 minutos. Después, la mezcla se extrae con EtOAc. La fase orgánica resultante se lava con salmuera y después se seca sobre MgSO₄, antes de concentrarse, produciendo un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (EtOH al 3%/EtOAc) produce el compuesto ccii (140 mg, 33%).



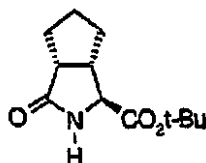
ccii

15

Ejemplo Intermedio 192 - Compuesto ccxiv

20 A una solución del compuesto cciii, terc-butyl (*N*-difenilmetileno)-glicina éster, (6 g, 0,0206 mmol) y PTC quiral (1,08 g, 0,00206 mmol) en DCM seco (48 ml), en una atmósfera de N₂, a -60 °C, se le añade CsOH·H₂O (6,9 g, 0,0412 mmol). A la mezcla de reacción se le añade gota a gota 1-carboxi-1-ciclopenteno metil éster (5,2 ml, 0,0412 mmol) en 10 ml de DCM. La mezcla se agita durante 4 días a -60 °C, después se diluye con 200 ml de Et₂O y se añaden 15 ml de una solución acuosa saturada de NH₄Cl. Las fases se separan y la fase orgánica se lava con 15 ml de agua y 15 ml de salmuera. Las fases acuosas se extraen con 100 ml de Et₂O. Las fases orgánicas se unen y se secan sobre Na₂SO₄. El producto en bruto se obtiene por la eliminación del disolvente disuelto en 100 ml de EtOH y después se añaden NH₂OH·HCl (1,43 g, 0,0206 mmol) y NaOAc (1,68 g, 0,0206 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Después, el disolvente se retira y el residuo en bruto obtenido se purifica directamente por cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc al 30%-50%/hexano, produciendo el compuesto cciv (65%) en forma de un sólido de color blanco. C₁₂H₁₉NO₃ (PM = 225,29); EM: m/z (M⁺ + 1) = 226,5. Exceso enantiomérico: 18% de e.e., determinado por HPLC Quiral.

25

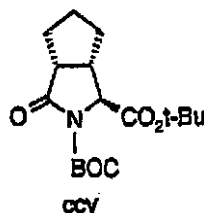


cciv

Ejemplo Intermedio 193 - Compuesto ccv

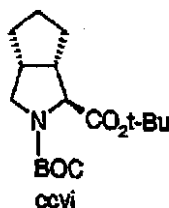
30 A una solución del compuesto cciv (2 g, 0,0088 mmol) en 60 ml de ACN se le añade una cantidad catalítica de DMAP (0,216 g, 0,0017 mmol) y una solución de dicarbonato de di-terc-butilo (2,49 g, 0,011 mmol) en 30 ml de ACN. La mezcla se agita durante 14 horas a temperatura ambiente, después se diluye con 100 ml de DCM y se lava con NaHCO₃ saturado (10 ml) y con salmuera (10 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. La evaporación del

disolvente produce un producto en bruto que se purifica sobre una columna de gel de sílice eluyendo con EtOAc al 15%/hexano, para dar el compuesto ccv (86%) en forma de un sólido de color blanco. $C_{17}H_{27}NO_5$ PM = 325,40 EM: $m/z (M^+ + 1) = 326,2$



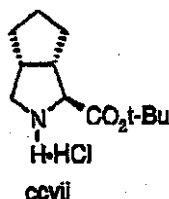
5 Ejemplo Intermedio 194 - Compuesto ccvi

A una solución del compuesto ccv (1,7 g, 0,0052 mmol) en 50 ml de THF (0,14 M) a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ se le añade DIBAL-H (7,8 ml, 0,0078 mmol). La mezcla se agita durante 1 hora y después se añaden 10 ml de MeOH. La mezcla se diluye con 25 ml de EtOAc y 25 ml de una solución acuosa saturada de tartrato sódico, y después se agita a temperatura ambiente durante una hora. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae una vez con 50 ml de EtOAc. Las fases orgánicas se combinan y se secan sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente da un residuo en bruto que se usa sin purificación. El producto en bruto se disuelve en 25 ml de DCM, se añade Et_3Si (0,84 ml, 0,0052 mmol), y después la mezcla se enfría a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ antes de la adición gota a gota de BF_3OEt_2 (0,71 ml, 0,0061 mmol). Después de 30 minutos, se añaden Et_3Si (0,84 ml) y BF_3OEt_2 (0,71 ml) y la mezcla se agita durante 2 horas a $78\text{ }^\circ\text{C}$. Después, la reacción se interrumpe con $NaHCO_3$ acuoso saturado (10 ml) y se extrae con DCM (2 x 20 ml). Las fases orgánicas se combinan y se secan sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente da un residuo en bruto que se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc al 13%/hexano, produciendo el compuesto ccvi (87%). $C_{17}H_{29}NO_4$ PM = 311,42 EM: $m/z (M^+ + 1) = 312,6$



20 Ejemplo Intermedio 195 - Compuesto ccvii

El compuesto ccvi (0,5 g, 0,0016 mmol) se disuelve en 8 ml de HCl 1 N en EtOAc (preparado burbujando HCl seco en EtOAc seco y después diluyendo a 1 N con más cantidad de EtOAc). La mezcla se agita durante 6 horas a temperatura ambiente. El disolvente se retira al vacío y el precipitado resultante se disuelve en Et_2O . Después de agitar la mezcla durante 15 minutos, el disolvente se retira a presión reducida. El sólido de color blanco resultante se lava con Et_2O y el compuesto ccvii (0,27 g, rendimiento del 80%) se aísla por filtración. $C_{12}H_{21}NO_2$ PM = 211,15 EM: $m/z (M^+ + 1) = 212,6$



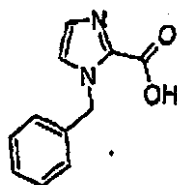
30 Ejemplo Intermedio 196 - Compuesto v

A una solución del compuesto ccvii (0,230 g, 0,74 mmol) en DCM (3,7 ml) se le añade TFA (2,85 ml). La mezcla se agita durante una noche, después el disolvente se retira al vacío a sequedad y el residuo se disuelve en EtOH (7,5 ml). La mezcla se enfría a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se añade gota a gota $SOCl_2$ (0,22 ml, 2,96 mmol) y después se calienta a reflujo durante 2 horas. El EtOH se retira a presión reducida y el residuo se disuelve en DCM (10 ml). La solución resultante se lava dos veces con una solución saturada acuosa de $NaHCO_3$ (5 ml). Las fases se separan y la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , y el disolvente se elimina al vacío, produciendo el compuesto v (80%) en forma de un aceite. $C_{10}H_{17}NO_2$ PM: 183,25 EM: $m/z (M^+ + 1) = 184,2$

35

Ejemplo Intermedio 197 - Compuesto cd

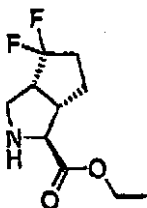
Se recoge 1-bencilimidazol (6 g, 37,9 mmol) en Et₂O (180 ml). La solución resultante se reduce a -60 °C y se trata con n-BuLi (1,6 M, 24 ml). La reacción se agita durante 30 minutos y después se burbujea CO₂ a través de la mezcla durante 15 minutos. El precipitado se filtra, se aclara con Et₂O y después se recoge en H₂O. Esta solución acuosa se acidifica a pH 3 con HCl 5 N. El producto deseado, cd, se aísla después de la liofilización en forma de un sólido de color blanco.



cd

Ejemplo Intermedio 198 - Compuesto cdi

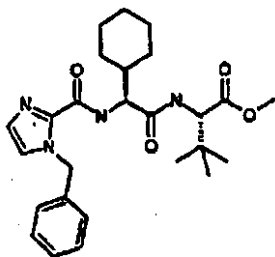
Una solución en DCM (100 ml) del compuesto i (9,25 g, 27,9 mmol) se trata a 0 °C con DAST (9,2 ml, 69,8 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la reacción se interrumpe con hielo y se extrae con DCM (200 ml). La fase orgánica se lava con salmuera y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 30%/hexanos), produciendo 8,5 g (86%) del intermedio fluorado deseado. Una porción de este intermedio (45 g, 14,2 mmol) se disuelve en EtOH (75 ml.). Esta solución se somete a condiciones de hidrogenación convencionales usando Pd (OH)₂/C (2,98 g, contenido de Pd al 20%, 4,26 mmol). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite. Los filtrados se concentran al vacío, produciendo el compuesto cdi (2,5 g, 96%).



cdi

Ejemplo Intermedio 199 - Compuesto cdii

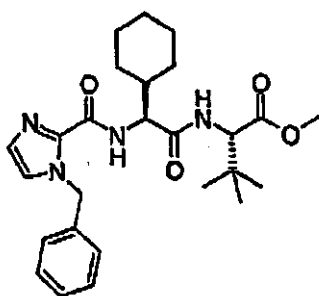
A una solución del compuesto cd (890 mg, 4,4 mmol) recogido en DCM (15 ml) se le añaden HOBT (595 mg, 4,4 mmol) y DCC (4,4 mmol, 1 M en DCM) y se agita durante 20 minutos. A esta mezcla se le añade una solución en DCM (15 ml) de lxxix' (990 mg, 3,5 mmol). La mezcla resultante se agita durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con EtOAc y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se concentra al vacío, para dar un residuo, que se purifica en EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto cdii (666 mg, 41%).



cdii

Ejemplo Intermedio 200 - Compuesto cdiii

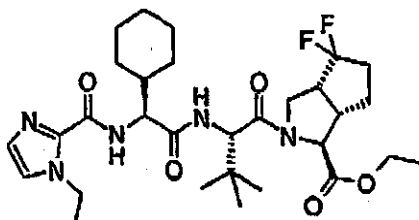
El compuesto cdiii se prepara a partir del compuesto cdii en condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol metílico (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.). Se recuperan 565 mg del compuesto cdiii (88%).



cdiii

Ejemplo Intermedio 201 - Compuesto cdiv

El compuesto cdiii (1,24 mmol) se recoge en DCM (5 ml). Se añade DCC (1,6 mmol, DCM 1 M) seguido de HOAT (1,6 mmol). La mezcla resultante se agita durante 20 minutos y



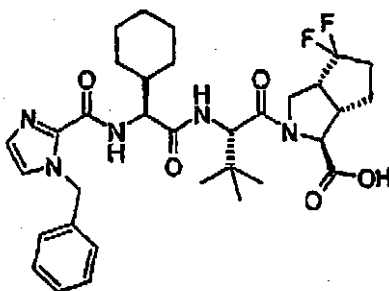
cdiv

5

el compuesto cdi (1,6 mmol) se añade gota a gota en THF (8 ml). La reacción se agita durante una noche. La reacción se filtra y se aclara con EtOAc. La fase orgánica combinada se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra. La purificación se consigue en EtOAc al 30%/Hexanos, produciendo el compuesto cdv (565 mg, 70%). cdv

10 Ejemplo Intermedio 202 - cdv

El compuesto cdv (565 mg, 0,86 mmol) se prepara a partir del compuesto cdv en condiciones de hidrólisis convencionales usando alcohol etílico (10 ml) y NaOH 1 N (3 equiv.). Se recuperan 490 mg (91%) del compuesto cdv.

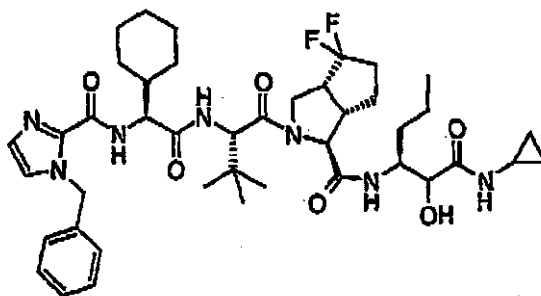


cdv

15 Ejemplo Intermedio 203 - cdvi

El compuesto cdv (490 mg, 0,78 mmol) se recoge en DCM (10 ml). A la solución en DCM se le añade PyBOP (520 mg, 1 mmol) seguido de una solución en THF (10 ml) de xiii (186 mg, 1 mmol). A la mezcla de reacción se le añade DIEA (0,1,8 ml, 1 mmol) y se agita durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. Al día siguiente, la reacción se diluye con EtOAc, se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La purificación se consigue en EtOAc al 100%, produciendo el compuesto cdvi (478 mg, 77%),

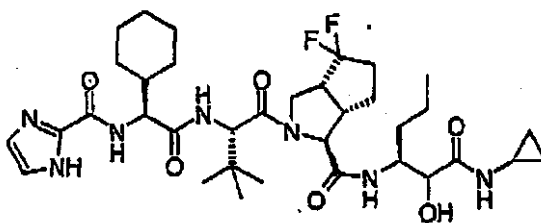
20



cdvi

Ejemplo Intermedio 204 - cdvii

5 El compuesto cdvi (478 mg, 0,6 mmol) se hidrogena usando Pd(OH)₂/C (base seca al 20%, 100 mg) en MeOH (40 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de hidrógeno. En este momento, la mezcla de reacción se filtra a través de Celite y se concentra, produciendo el compuesto cdvii (417 mg, 98%).

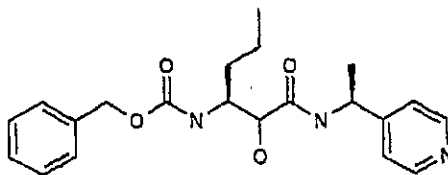


cdvii

Ejemplo Intermedio 205- cdx

10 El compuesto cxxv (adquirido en Albany Molecular Research Inc., 1,5 g, 5,2 mmol) se recoge en DCM (15 ml). A esta solución se le añaden PyBOP (2,7 g, 5,2 mmol) y HOBt (700 mg, 5,2 mmol). A la solución anterior se le añade una solución en THF (1,5 ml) de (-)-alfa-(4-piridil)etil amina (640 mg, 5,2 mmol) seguido de DIEA (0,93 mg, 5,2 mmol). [La (-)-alfa-(4-piridil)etil amina se obtiene a partir de la sal tartrato de (-)-alfa-(4-piridil)etil amina (Aldrich) mediante agitación con NaOH 1 N (2 equiv.) durante 1 hora seguido de la extracción con EtOAc (3 x), recuperación del 70%].

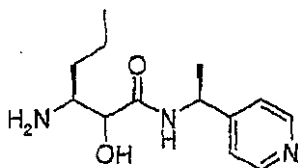
15 La reacción se agita durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. El producto se purifica en EtOH al 5%/EtOAc, produciendo 2 g (99%) del compuesto intermedio cdx.



cdx

Ejemplo Intermedio 206 - cdviii

20 El compuesto cdx (2 g, 5,2 mmol) se hidrogena usando Pd al 10%/C (500 mg) en MeOH (50 ml). La mezcla de reacción se agita durante una noche en una atmósfera de hidrógeno. El producto se filtra a través de celite y se concentra, para dar el compuesto cdviii (1,3 g 98%).



cdviii

Farmacología

Los compuestos de acuerdo con la invención se describen en el presente documento como útiles por ser capaces de inhibir la proteasa de HCV, y por tanto, también son útiles para inhibir la replicación de HCV.

- 5 Por consiguiente, una invención en el presente documento se refiere al uso de los compuestos de la invención en la inhibición de la proteasa de HCV que comprende poner en contacto una cantidad inhibidora de proteasa anti-HCV de un compuesto de fórmula 1 con una composición que comprende proteasa de HCV.

10 Otra invención más en el presente documento se refiere al uso de los compuestos de la invención en la inhibición de la replicación de HCV que comprende poner en contacto HCV con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 1. Además, otra invención en el presente documento se refiere al uso de los compuestos de la invención en el tratamiento de un paciente que padece o es objeto de una infección por HCV que comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de fórmula 1. Debe entenderse que las referencias en el presente documento al tratamiento de una infección por HCV incluyen terapia profiláctica para prevenir o inhibir la infección así como el tratamiento de una infección establecida aguda o crónica por HCV o afecciones fisiológicas asociadas con infección por HCV para curar esencialmente al paciente de la infección, inhibir el grado (cantidad) de infección o mejorar las afecciones fisiológicas asociadas con la misma. Se entiende que "cantidad eficaz" describe una cantidad del compuesto de la presente invención eficaz dentro del alcance del criterio biológico razonable, adecuada para su uso en contacto con las células de seres humanos y otros mamíferos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y es conmensurable con una proporción beneficio/riesgo razonable en el tratamiento de una infección por HCV y por tanto en la producción del efecto terapéutico deseado.

Las afecciones fisiológicas analizadas en el presente documento incluyen algunas, pero no todas, las posibles situaciones clínicas en que está justificado tratamiento anti-HCV. Los especialistas en este campo son muy conscientes de las circunstancias que requieren cualquier tratamiento anti-HCV.

25 Un aspecto particular de la invención proporciona un compuesto para su uso de acuerdo con la invención, que se administra en forma de una composición farmacéutica, aunque el compuesto puede administrarse solo. "Composición farmacéutica" significa una composición que comprende un compuesto de fórmula 1 y al menos un componente seleccionado entre el grupo que comprende medios, diluyentes, recubrimientos, adyuvantes, excipientes, o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes conservantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizadores de emulsión, agentes de suspensión, agentes isotónicos, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, otros agentes terapéuticos, agentes lubricantes, agentes retardadores o promotores de la adsorción, y agentes de administración, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y formas de dosificación. Las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires o jarabes. Agentes de suspensión ejemplares incluyen alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias. Agentes antibacterianos y antifúngicos ejemplares para la prevención de la acción de microorganismos incluyen parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Agentes isotónicos ejemplares incluyen azúcares, cloruro sódico y similares. Agentes retardadores de la adsorción ejemplares para prolongar la absorción incluyen monoesterato de aluminio y gelatina. Agentes promotores de la adsorción ejemplares para potenciar la absorción incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. Medios, diluyentes, disolventes, vehículos, agentes solubilizantes, emulsionantes y estabilizadores de emulsión ejemplares, incluyen agua, cloroformo, sacarosa, etanol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, tetrahidrofurfuril alcohol, benzoato de bencilo, polioles, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, glicerol, polietilenglicoles, dimetilformamida, Tween® 60, Span® 80, alcohol cetostearílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, aceites vegetales (tales como aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, y similares, o mezclas adecuadas de estas sustancias. Excipientes ejemplares incluyen lactosa, azúcar de la leche, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato dicálcico. Agentes disgregantes ejemplares incluyen almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos. Lubricantes ejemplares incluyen estearato de magnesio, lauril sulfato sódico, talco, así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

- Pueden usarse otros agentes terapéuticos en combinación con un compuesto de la presente invención, incluyendo otros agentes anti-HCV. Algunos agentes anti-HCV conocidos ejemplares incluyen agentes inmunomoduladores, tales como α -, β - o γ - interferones; compuestos de interferón- α derivatizados y pegilados, otros agentes antivirales tales como ribavirina y amantadina; otros inhibidores de proteasa de hepatitis C; inhibidores de otras dianas en el ciclo vital del HCV incluyendo compuestos antivirales de helicasa, polimerasa, metaloproteasa, entrada interna al ribosoma, o de amplio espectro tales como VX-497, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa celular, IMPDH, cubierta por la patente de Estados Unidos N° 5.807.876; o combinaciones de los mismos. Los agentes terapéuticos usados en combinación con un compuesto de la presente invención pueden administrarse por separado, de forma simultánea o secuencialmente.
- La elección de material en la composición farmacéutica diferente del compuesto de fórmula 1 se determina generalmente de acuerdo con las propiedades químicas del compuesto activo tales como la solubilidad, el modo particular de administración y las disposiciones a observar en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, excipientes tales como lactosa, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato dicálcico y agentes disgregantes tales como almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato sódico y talco pueden usarse para preparar comprimidos.
- Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en formas variadas tales como comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires o jarabes.
- "Forma líquida de dosificación" significa que la dosis del compuesto activo a administrar al paciente está en forma líquida, por ejemplo, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas líquidas de dosificación pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes.
- También pueden emplearse composiciones sólidas como cargas en cápsulas blandas y duras de gelatina rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.
- Cuando se usan suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión.
- La fase oleosa de la composición farmacéutica en emulsión puede constituirse a partir de ingredientes conocidos de un modo conocido. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (de otro modo conocido como emulgente), deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. En conjunto, el emulsionante o emulsionantes con o sin estabilizador o estabilizadores componente la cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa componente la base de pomada emulsionante que forma la fase dispersada oleosa de las formulaciones de crema.
- Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos el 30% p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma deseable un compuesto que potencia la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas.
- La elección de los aceites o grasas adecuados para una formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas. Por tanto, la crema debe ser preferentemente un producto no grasiento, que no mancha y lavable con consistencia adecuada para evitar su filtración desde tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo mono- o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como miristato de diisopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como vaselina blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.
- En la práctica, puede administrarse un compuesto/composiciones farmacéuticas de la presente invención en una formulación adecuada a seres humanos y animales por administración tópica o sistémica, incluyendo oral por inhalación, rectal, nasal, bucal, sublingual, vaginal, colónica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), intracisternal e intraperitoneal. Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del destinatario.
- "Formas de dosificación farmacéuticamente aceptables" se refiere a formas de dosificación del compuesto de la invención, e incluye, por ejemplo, comprimidos, píldoras, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas, incluyendo suspensiones, pulverizaciones, comprimidos inhalantes, grageas, emulsiones, soluciones, gránulos, cápsulas y supositorios, así como preparaciones líquidas para inyecciones, incluyendo preparaciones de liposoma. Pueden hallarse técnicas y formulaciones en líneas generales en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA última edición.

Las "formulaciones adecuadas para administración oral" pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como polvo o gránulos, como solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión líquida de agua-en-aceite. El ingrediente activo también puede presentarse en forma de bolo, electuario o pasta.

Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo, creando una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente, mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeado en una máquina adecuada una mezcla de los compuestos en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden opcionalmente recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del ingrediente activo dentro.

Las composiciones sólidas para administración rectal incluyen supositorios formulados de acuerdo con procedimientos conocidos y que contienen al menos un compuesto de la invención.

Si se desea, y para una distribución más eficaz, los compuestos pueden microencapsularse en, o adherirse a, sistemas de suministro de liberación lenta o dirigidos tales como matrices poliméricas biocompatibles, biodegradables (por ejemplo, poli(D,L-lactida co-glicolida)), liposomas, y microesferas e inyectarse por vía subcutánea o intramuscular mediante una técnica llamada depósito subcutáneo o intramuscular para proporcionar liberación lenta continua del compuesto o compuestos durante un periodo de 2 semanas o más. Los compuestos pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso.

"Formulaciones adecuadas para administración nasal o por inhalación" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma nasal o por inhalación a un paciente. La formulación puede contener un vehículo, en forma de polvo, que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tales como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.). Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para su administración como, por ejemplo, una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol pueden prepararse de acuerdo con procedimientos convencionales y pueden suministrarse con otros agentes terapéuticos. La terapia de inhalación se administra fácilmente mediante inhaladores de dosis medida.

"Formulaciones adecuadas para administración oral" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma oral a un paciente. Las formulaciones pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión de agua-en-aceite. El ingrediente activo también puede presentarse en forma de bolo, electuario o pasta.

"Formulaciones adecuadas para administración parenteral" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma parenteral a un paciente. Las formulaciones son estériles e incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones acuosas y no acuosas de inyección, que pueden contener agentes de suspensión y agentes espesantes y anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la formulación isotónica, y tienen un pH ajustado adecuado, con la sangre del destinatario pretendido.

"Formulaciones adecuadas para administración rectal o vaginal" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma rectal o vaginal a un paciente. La formulación está preferentemente en forma de supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperaturas normales pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el componente activo.

"Formulaciones adecuadas para administración sistémica" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma sistémica a un paciente. La formulación se administra preferentemente por inyección, incluyendo transmuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. Para inyección, los compuestos de la invención se formulan en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La administración sistémica también puede ser mediante instrumentos transmucosa o transdérmicos, o los compuestos pueden administrarse por vía oral. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para penetrar en la barrera. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, sales biliares y derivados de ácido fusídico para administración transmucosa. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la penetración. La administración transmucosa puede ser a través del uso

de pulverizadores nasales, por ejemplo, o supositorios. Para administración oral, los compuestos se formulan en formas convencionales de administración oral tales como cápsulas, comprimidos, y tónicos.

"Formulaciones adecuadas para administración tópica" significa formulaciones que están en una forma adecuada para administrarse de forma tópica a un paciente. La formulación puede presentarse como una pomada tópica, ungüentos, polvos, pulverizaciones e inhalantes, geles (basados en agua o alcohol), cremas, como se sabe en líneas generales en la técnica, o puede incorporarse en una base de matriz para su aplicación en un parche, que permitiría una liberación controlada de los compuestos a través de la barrera transdérmica. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de pomada de parafina o miscible en agua. Como alternativa, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite-en-agua. Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen colirios en los que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y forma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

"Forma sólida de dosificación" significa que la forma de dosificación del compuesto de la invención está en forma sólida, por ejemplo cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grageas o gránulos. En dichas formas sólidas de dosificación, el compuesto de la invención se mezcla con al menos un excipiente (o vehículo) habitual inerte tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o diluyentes, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardantes de solución, como por ejemplo parafina, (f) acelerantes de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, (j) agentes opacificantes, (k) agentes tamponantes, y agentes que liberan el compuesto o compuestos de la invención en una cierta parte del tracto intestinal de un modo retardado.

Los niveles reales de dosificación del ingrediente o ingredientes activos en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener una cantidad de ingrediente o ingredientes activos que sea eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición particular y procedimiento de administración para un paciente. Un niveles seleccionado de dosificación para cualquier paciente particular, por lo tanto, depende de una diversidad de factores incluyendo el efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada de tratamiento, la etiología y gravedad de la enfermedad, el estado, peso, sexo, dieta y edad del paciente, el tipo y potencia de cada ingrediente activo, las tasas de absorción, metabolismo y/o excreción y otros factores.

La dosis diaria total de los compuestos de la presente invención a un paciente en dosis individuales o divididas puede ser en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y preferentemente de 0,01 a 10 mg/kg/día. Por ejemplo, en un adulto, las dosis son generalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día por inhalación, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente 0,1 a 70, más especialmente de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal por día por administración oral, y de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, preferentemente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal por día por administración intravenosa. El porcentaje de ingrediente activo en una composición puede variarse, aunque debe constituir una proporción tal que se obtenga una dosificación adecuada. Las composiciones unitarias de dosificación pueden contener cantidades de submúltiplos de las mismas que pueden usarse para componer la dosis diaria. Obviamente, pueden administrarse varias formas unitarias de dosificación en aproximadamente el mismo momento. Una dosificación puede administrarse tan frecuentemente como sea necesario para obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder rápidamente a una dosis mayor o menor y pueden hallar adecuado dosis de mantenimiento mucho más débiles. Para otros pacientes, puede ser necesario tener tratamientos a largo plazo a la tasa de 1 a 4 dosis por día, de acuerdo con las necesidades fisiológicas de cada paciente particular. Huelga decir que, para otros pacientes, será necesario prescribir no más de una o dos dosis por día.

Las formulaciones pueden prepararse en forma unitaria de dosificación por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, conformando el producto.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de una dosis o múltiples dosis, por ejemplo, ampollas precintadas y viales con tapones elastoméricos, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones improvisadas de inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

Los compuestos dentro del alcance de la presente invención muestran marcadas actividades farmacológicas de acuerdo con ensayos descritos en la bibliografía y a continuación, y se cree que los resultados de los ensayos se correlacionan con la actividad farmacológica en seres humanos y otros mamíferos.

Procedimiento de ensayo enzimático in vitro

5 Inhibición de la serina proteasa NS3 de HCV

El dominio proteasa NS3 de HCV se expresó y se purificó como se ha descrito previamente (Vertex, publicación PCT WO98/17679; que se incorpora en este documento como referencia). El sustrato peptídico cromogénico, EDVVAbuC-p-nitroanilida, y el fragmento cofactor NS4A (-KKGSVVIVGRIVLSGK-) para la proteasa NS3 se sintetizaron de forma personalizada por American Peptide Com (Ca). Los compuestos de la presente invención se ensayaron para su capacidad de inhibir la actividad proteasa NS3 de HCV usando una ensayo espectrofotométrico con EDVVAbuC-p-nitroanilida como sustrato. El ensayo se ejecutó en una placa de microtitulación de 96 pocillos usando un lector SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con capacidad cinética. La escisión del sustrato EDVVAbuC-p-nitroanilida (500 μ M) por la proteasa NS3 de HCV purificada (0,5 μ M) se realizó a 30°C en el tampón que contenía fragmento NS4A 30 μ M, Hepes 46 mM, pH 8,0, NaCl 92 mM, glicerol al 18%, DTT 5 mM, y DMSO al 7,5% en ausencia o presencia del compuesto de ensayo. La reacción se controló para la liberación de pNA (p-nitroanilina) a 405 nm.

La determinación de los parámetros cinéticos incluyendo V_{max} , K_m y V_{max}/K_m se realiza en las condiciones descritas anteriormente. Los valores de K_i se calculan a partir de gráficos de velocidad frente a [inhibidor], a concentraciones fijas de enzima y sustrato, mediante un ajuste de mínimos cuadrados no lineal de los datos para la ecuación de Morrison para una estricta inhibición competitiva de la unión [J. F. Morrison, Biochim. Biophys. Acta., 185, 269-286 (1969)]. Se usa el programa Prism (GraphPad Software, Inc.) para este procedimiento.

Los inhibidores de serina proteasa de HCV desvelados en el presente documento pueden usarse en combinación con otras moléculas que muestran directamente o provocan indirectamente actividad anti-HCV de forma profiláctica en pacientes en riesgo de contraer infección por HCV, o para tratar pacientes que ya están infectados. La expresión "actividad anti-HCV" se refiere a la capacidad de una molécula, cuando está presente, de inhibir completamente o reducir la acumulación de viriones de HCV en comparación con la acumulación de viriones de HCV en ausencia de dicha molécula, y/o la capacidad de una molécula de reducir o mejorar las afecciones o síntomas asociados con infección o patogénesis por HCV en los pacientes. Las moléculas que tienen actividad anti-HCV incluyen aquellas que alteran una o más etapas en la infección o replicación del HCV, así como aquellas que provocan acciones inmunomoduladoras y antiproliferativas en células huésped. Las moléculas que tienen actividad anti-HCV pueden inhibir los eventos replicativos específicos de HCV tales como, aunque sin limitación, la síntesis de ácido nucleico o proteína dirigida por HCV. Las fases de replicación de HCV en las que las moléculas que tienen actividad anti-HCV pueden actuar incluyen la entrada en la célula (por ejemplo, penetración por adhesión); pérdida de revestimiento y liberación del genoma de HCV; replicación del genoma de HCV (por ejemplo, replicación de cualquier hebra del genoma ARN viral; transcripción del ARN mensajero viral); traducción de las proteínas de HCV; modificación post-traducciona de las proteínas de HCV (por ejemplo, escisión proteolítica; glucosilación); transporte intracelular de proteínas virales; ensamblaje de los componentes del virión; y liberación de las partículas virales (por ejemplo, gemación). Las clases de moléculas que tienen actividad anti-viral incluyen, aunque sin limitación, señuelos solubles de receptor y anticuerpos anti-receptor; bloqueantes de canales de iones, estabilizadores de cápsida, e inhibidores de proteínas de fusión; inhibidores de polimerasas virales, transcriptasa inversa, helicasa, primasa, o integrasa; oligonucleótidos antisentido y ribozimas; agentes inmunomoduladores e inmunostimuladores, incluyendo citoquinas tales como interferones, así como agonistas peptídicos, esteroides, y fármacos clásicos tales como levamisol; inhibidores de proteínas reguladoras; inhibidores de proteasa; inhibidores proteicos de ensamblaje; y anticuerpos antivirales y linfocitos citotóxicos. La expresión "cantidad eficaz anti-HCV" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto, o combinación de compuestos desvelados en el presente documento, eficaz para reducir o mejorar las afecciones o síntomas asociados con infección por HCV o patogénesis asociada en pacientes, o para reducir los niveles virales in vitro o in vivo. Las aplicaciones in vitro incluyen el sistema de ensayo de replicación, descrito a continuación, donde dichas cantidades son eficaces para reducir la acumulación de ARN del replicón de HCV y/o la acumulación de proteínas codificadas por genes contenidos en el mismo.

50 Los compuestos que tienen actividad anti-HCV contemplados para su uso en las composiciones y procedimientos de terapia de combinación desvelados en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, moléculas inmunomoduladoras, incluyendo citoquinas inmunostimuladoras, y otros compuestos que se sabe que tienen actividad antiviral de HCV, tales como diversos nucleósidos y nucleótidos antivirales.

Las moléculas inmunomoduladoras contempladas para su uso en combinación con los inhibidores de la serina proteasa de HCV desvelados en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, interferón-alfa 2B (Intron A, Schering Plough); Rebatron (Schering Plough, Interferón-alfa 2B + Ribavirina); interferón alfa pegilado (Reddy, K.R. y col. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. Hepatology 33, 433-438 (2001)); interferón consenso (Kao, J.H., Chen, P.J. Lai, M.Y. y Chen, D.S. Efficacy of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C. J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 1418-1423 (2000)); interferón-alfa 2A (Roferon A; Roche); interferón linfoblastoide o "natural"; interferón tau

(Clayette, P. y col. IFN-tau, a new interferon type I with antiretroviral activity. *Pathol. Biol. (Paris)* 47, 553-559 (1999)); interleuquina 2 (Davis, G.L., Nelson, D.R. y Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); interleuquina 6 (Davis, G.L., Nelson, D.R. y Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); interleuquina 12 (Davis, G.L., Nelson, D.R. y Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); Ribavirina; y compuestos que potencian el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1 (Davis, G.L., Nelson, D.R. y Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)). Los interferones pueden mejorar las infecciones virales ejerciendo efectos antivirales directos y/o modificando la respuesta inmune a la infección. Los efectos antivirales de los interferones a menudo están mediados a través de la inhibición de la penetración viral o la pérdida de revestimiento, la síntesis del ARN viral, la traducción de proteínas virales, y/o el ensamblaje y liberación del virus.

Los compuestos que estimulan la síntesis de interferón en células (Tazulakhova, E.B., Parshina, O.V., Gusev, T.S. y Ershov, F.I. Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers. *J. Interferon Cytokine Res.* 21,65-73) incluyen, aunque sin limitación, ARN bicatenario, solo o en combinación con tobramicina, e Imiquimod (3M Pharmaceuticals) (Sauder, D.N. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, S6-11(2000)).

Otros compuestos que se sabe que tienen, o que pueden tener, actividad antiviral de HCV en virtud de mecanismos no inmunomoduladores incluyen, aunque sin limitación, Ribavirina (ICN Pharmaceuticals); inhibidores de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (VX-497, en desarrollo por Vertex Pharmaceuticals); amantadina y rimantadina (Younossi, A.M. y Perillo, R.P. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 95-102 (1999)); LY217896 (patente de Estados Unidos 4.835.168) (Colacino, J.M. y col. Evaluation of the anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamide (LY217896) and its sodium salt. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 34, 2156-2163 (1990)); y éster metílico del ácido 9-hidroxiimino-6-metoxi-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-fenantreno-1-carboxílico; éster metílico del ácido 6-metoxi-1,4a-dimetil-9-(4-metil-piperazin-1-ilimino)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-fenantreno-1-carboxílico-clorhidrato; 1-(2-cloro-fenil)-3-(2,2-difenil-etil)-urea (patente de Estados Unidos 6.127.422).

Las formulaciones, dosis, y vías de administración para las moléculas anteriores se muestran en las referencias citadas a continuación, o son bien conocidas en la técnica como se desvela, por ejemplo, en F.G. Hayden, en Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Novena Edición, Hardman y col., Eds., McGraw-Hill, Nueva York (1996), Capítulo 50, pág. 1191-1223, y las referencias citadas en el mismo. Como alternativa, una vez se ha identificado un compuesto que muestra actividad antiviral de HCV, una cantidad farmacéuticamente eficaz de ese compuesto puede determinarse usando técnicas que son bien conocidas para los especialistas en la técnica. Considere, por ejemplo, Benet y col., en Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Novena Edición, Hardman y col., Eds., McGraw-Hill, Nueva York (1996), Capítulo 1, pág. 3-27, y las referencias citadas en el mismo. Por tanto, las formulaciones apropiadas, intervalos de dosis, y regímenes de dosificación, de dicho compuesto pueden determinarse fácilmente por procedimientos rutinarios.

Las combinaciones de fármaco de la presente invención pueden proporcionarse a una célula o células, o a un paciente humano, en formulaciones separadas farmacéuticamente aceptables administradas simultánea o secuencialmente, formulaciones que contienen más de un agente terapéutico, o por una clasificación de formulaciones de agente individual y múltiples agentes. Sin embargo, administradas, estas combinaciones de fármacos forman una cantidad anti-HCV eficaz de componentes.

Actualmente está disponible una gran cantidad de inmunomoduladores e inmunoestimuladores que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención e incluyen: AA-2G, dipéptido adamantilamida; adenosina desaminasa, Enzon; adyuvante, Alliance; adyuvantes, Rib; adyuvantes, Vaxcel; Adjuvax; agelasfina-11; terapia contra el SIDA, Chiron; glucano de algas, SRI; algammulina, Anutech; Anginlye; factores anticelulares, Yeda; Anticort; inmunógeno antigástrina-17, Ap; sistema de suministro de antígeno, Vac; formulación de antígeno, IDBC; inmunógeno antiGnRH, Aphton; Antiherpin; Arbidol; azarol; Bay-q-8939; Bay-r-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001; BL-009; Broncostat; Cantastim; CDRI-84-246; cefodizima; inhibidores de quimioquina, ICOS; péptidos CMV, City of Hope; CN-5888; agente liberador de citoquinas, St; DHBAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; ditiocarb sodio; ECA-10-142; ELS-1; endotoxina, Novartis; FCE-20696; FCE-24089; FCE-24578; ligando FLT-3, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; proteínas G, Cadus; glutapcina; glutaurina; glucosfopeptical; GM-2; GM-53; GAMP; vacuna de factor de crecimiento, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; vacuna contra *Helicobacter pylori*; factor inmune específico de herpes; terapia contra VIH, United Biomed; HyperGAM+CF; ImmunMax; Immun BCG; terapia inmune, Connective; inmunomodulador, Evans; inmunomoduladores, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; inosina pranobex; interferón, Dong-A (alfa2); interferón, Genentech (gamma); interferón, Novartis (alfa); interleuquina-12, Genetics Ins; interleuquina-15, Immunex; interleuquina-16, Research Cor; ISCAR-1; J005X; L-644257; ácido licomarasmínico; LipoTher, LK-409; LX-410; LP-2307; LT (R1926); LW-50020; MAF, Shionogi, derivados de MDP, Merck; met-enkefalina, TNI; metilfulirilbutirolactonas MIMP; mirimostim; vacuna bacteriana mixta, Tem; MM-1; moniliastat; MPLA, Rib; MS-705; murabutida; murabutida, Vacsyn; derivado de muramill dipéptido; derivados de muramill péptido yelopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; péptidos, Scios; peptidoglucano, Pliva;

- Perthon, Advanced Plant; derivado de PGM, Pliva; Pharmaprojects N° 1099; N° 1426; N° 1549; N° 1585; N° 1607; N° 1710; N° 1779; N° 2002; N° 2060; N° 2795; N° 3088; N° 3111; N° 3345; N° 3467; N° 3668; N° 3998; N° 3999; N° 4089; N° 4188; N° 4451; N° 4500; N° 4689; N° 4833; N° 494; N° 5217; N° 530; pidotimod; pimelautida; pimafile; PMD-589; podofilotoxina, Conpharm; POL-509; poli-ICLC; poli-ICLC, Yamasa Shoyin; PoliA-PoliU; polisacárido A; proteína A, Berlox Bioscience; PS34WO; MAb de Pseudomonas, Teijin; Psmaglobina; PTL-78419; Pirexol; piriferona; Retrogen; Retropep; RG-003; Rhinostat; rifamaxil; RM-06; Rollin; romurtida; RU-40555; RU-41821; anticuerpos contra la rubéola, ResCo; S-27609; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL-953; SK&F-107647; SL04; SL05; SM- 4333; Solutein; SRI-62-834; SRL-172; ST-5470; ST-789; lisado de fagos de estafilococos; Stimulon; supresina; T-150R1; T-LCEF; tabilautida; temurtida; Theradigm-HBV; Theradigm-HPV; Theradigm-HSV; THF, Pharm & Upjohn; THF, Yeda; timalfasina; fracciones de hormona tímica; timocartina; timolinfotropina; timopentina; análogos de timopentina; timopentina, Peptech; fracción 5 de timosina, Alpha; timostimulina; timotrinano; TMD-232; TO-115; factor de transferencia, Viragen; tuftsina, Selavo; ubenimex; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IP-A-2+; IF-B+; IF-G+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-12+; IL-15+; IM+; LHRH-; LIPCOR+L LYM-B+; LYM-NK+; LYM-T+; OPI+; PBP+; PHG-MA+; RNA-SYN-; SY-CW-; TH-A-1+; TH-5+; TNF+; UN.
- Compuestos nucleosídicos y nucleotídicos representativos útiles en la presente invención incluyen, aunque sin limitación: (+)-cis-5-fluoro-1-[2-(hidroxi-metil)-[1,3-oxatiolan 5-il]citosina; (-)-2'-desoxi-3'-tiocitidina-5'-trifosfato (3TC); (-)-cis-5-fluoro-1-[2-(hidroxi-metil)-[1,3-oxatiolan-5-il]citosina (FTC); (-) 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina [(-)-Sd-dC]; 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosina (FIAC); 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosina trifosfato (FIACTP); 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-metiluracilo (FMAU); 1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida; 2',3'-didesoxi-3'-fluoro-5-metil-dexocitidina (FddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metil-dexocitidina (ClddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metil-dexocitidina (AddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-fluoro-5-metil-citidina (FddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metil-citidina (ClddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metil-citidina (AddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-fluorotimidina (FddThd); 2',3'-didesoxi-beta-L-5-fluorocitidina (beta-L-FddC); 2',3'-didesoxi-beta-L-5-tiacitidina; 2',3'-didesoxi-beta-L-5-citidina (beta-L-ddC); 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina; 2'-desoxi-3'-tia-5-fluorocitosina; 3'-amino-5-metil-dexocitidina (AddMeCyt) ; 2-amino-1,9-[(2-hidroximetil-1-(hidroximetil)etoxi]metil]-6H-purin-6-ona (ganciclovir); 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-il)etil]-1,3-propandil diacetal (famciclovir); 2-amino-1,9-dihidro-9-[(2-hidroxi-etoxi)metil]6H-purin-6-ona (aciclovir); 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-but-1-il)guanina (penciclovir); 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-but-1-il)-6-desoxi-guanina diacetato (famciclovir); 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT); 3'-cloro-5-metil-dexocitidina (ClddMeCyt); 9-(2-fosfonil-metoxietil) 2',6'-diaminopurina-2',3'-didesoxi-ribósido; 9-(2-fosfonilmetoxietil) adenina (PMEA); aciclovir trifosfato (ACVTP); D-carbociclo-2'-desoxiguanosina (CdG); didesoxi-citidina; didesoxi-citosina (ddC); didesoxi-guanina (ddG); didesoxi-inosina (ddl); E-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina trifosfato; fluoro-arabino-furanosil-yodouracilo; 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodo-uracilo (FIAU); estavudina; 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purina-6-amina monohidrato (Ara-A); 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purina-6-amina-5'-monofosfato monohidrato (Ara-AMP); 2'-desoxi-3'-tia-5-fluorocitidina; 2',3'-didesoxi-guanina; y 2',3'-didesoxi-guanosina.

Los procedimientos sintéticos para la preparación de nucleósidos y nucleótidos útiles en la presente invención son bien conocidos en la técnica como se desvela en Acta Biochim. Pol., 43, 25-36 (1996); Swed. Nucleosides Nucleotides 15, 361-378 (1996); Synthesis 12,1465-1479 (1995); Carbohyd. Chem. 27, 242-276 (1995); Chem. Nucleosides Nucleotides 3, 421-535 (1994); Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press; y Exp. Opin. Invest. Drugs 4, 95-115 (1995).

Las reacciones químicas descritas en las referencias citadas anteriormente se desvelan en líneas generales en términos de su más amplia aplicación para la preparación de los compuestos de la presente invención. Ocasionalmente, las reacciones pueden no ser aplicables como se describe para cada compuesto incluido dentro del alcance de los compuestos desvelados en el presente documento. Los compuestos para los cuales sucede esto, se reconocerán fácilmente por los especialistas en la técnica. En todos estos casos, cualquiera de las reacciones puede realizarse satisfactoriamente mediante modificaciones convencionales conocidas para los especialistas en la técnica, por ejemplo, mediante protección apropiada de grupos de interferencia, cambiando los reactivos convencionales alternativos, mediante modificación rutinaria de las condiciones de reacción, y similares, o serán aplicables otras reacciones desveladas en el presente documento o de otro modo convencionales para la preparación de los compuestos correspondientes de la presente invención. En todos los procedimientos preparativos, todos los materiales de partida son conocidos o se pueden preparar fácilmente a partir de materias prima.

Aunque generalmente se emplean análogos nucleosídicos como agentes antivirales tal cual, los nucleótidos (fosfatos de nucleósido) a veces deben convertirse en nucleósidos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Un ejemplo de un nucleótido modificado químicamente capaz de entrar en las células es S-1-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil citosina (HPMPC, Gilead Sciences). Los compuestos nucleosídicos y nucleotídicos de la presente invención que son ácidos pueden formar sales. Ejemplos incluyen sales con metales alcalinos o metales alcalino-térreos, tales como sodio, potasio, calcio, o magnesio, o con bases orgánicas o sales básicas de amonio cuaternario.

Los inmunomoduladores e inmunoestimuladores útiles en los procedimientos de terapia de combinación de la presente invención pueden administrarse en cantidades inferiores a las convencionales en la técnica. Por ejemplo, el interferón alfa típicamente se administra a seres humanos para el tratamiento de infecciones por HCV en una

cantidad de aproximadamente 1×10^6 unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 10×10^6 unidades/persona tres veces por semana (Simon y col., Hepatology 25: 445-448 (1997)). En los procedimientos y composiciones de la presente invención, esta dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente $7,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana, más preferentemente de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 5×10^6 unidades/persona tres veces por semana; mucho más preferentemente de aproximadamente 1×10^5 unidades/persona tres veces por semana a aproximadamente 3×10^6 unidades/persona tres veces por semana. Debido a la potenciada eficacia antiviral contra el virus de la hepatitis C de los inmunomoduladores e inmunoestimuladores en presencia de los inhibidores de la serina proteasa de HCV de la presente invención, pueden emplearse cantidades reducidas de estos inmunomoduladores/inmunoestimuladores en los procedimientos y composiciones desvelados en el presente documento. Asimismo, debido a la potenciada eficacia antiviral contra el virus de la hepatitis C de los presentes inhibidores de la serina proteasa de HCV en presencia de inmunomoduladores e inmunoestimuladores, pueden emplearse cantidades reducidas de estos inhibidores de serina proteasa de HCV en los procedimientos y composiciones desvelados en el presente documento. Dichas cantidades reducidas pueden determinarse por control rutinario de los títulos del virus de la hepatitis C en pacientes infectados que están experimentando terapia. Esto puede realizarse, por ejemplo, controlando el ARN de HCV en el suero de los pacientes por técnicas slot-blot, dot-blot, o RT-PCR, o por medición de antígenos de HCV de superficie u otros. Los pacientes pueden controlarse de forma similar durante la terapia de combinación empleando los inhibidores de serina proteasa de HCV desvelados en el presente documento y otros compuestos que tienen actividad anti-HCV, por ejemplo agentes antivirales nucleosídicos y/o nucleotídicos, para determinar las dosis eficaces más vacas de cada uno cuando se usan en combinación.

En los procedimientos de terapia de combinación desvelados en el presente documento, pueden administrarse compuestos antivirales nucleosídicos o nucleotídicos, o mezclas de los mismos, a seres humanos en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/persona/día a aproximadamente 500 mg/persona/día; preferentemente de aproximadamente 10 mg/persona/día a aproximadamente 300 mg/persona/día; más preferentemente de aproximadamente 25 mg/persona/día a aproximadamente 200 mg/persona/día; incluso más preferentemente de aproximadamente 50 mg/persona/día a aproximadamente 150 mg/persona/día; y mucho más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/persona/día a aproximadamente 50 mg/persona/día.

Las dosis de los compuestos pueden administrarse a un paciente en una única dosis o en múltiples subdosis proporcionadas. En el último caso, las composiciones unitarias de dosificación pueden contener cantidades de submúltiplo de la misma para componer la dosis diaria. Múltiples dosis por día también pueden aumentar la dosis diaria total si así se desea por la persona que prescribe el fármaco.

El régimen para tratar a un paciente que padece una infección por HCV con los compuestos y/o composiciones de la presente invención se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo, dieta, y estado médico del paciente, la gravedad de la infección, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como los perfiles de actividad, eficacia, farmacocinética, y toxicología de los compuestos particulares empleados, y si se utiliza un sistema de suministro de fármaco. La administración de las combinaciones de fármacos desveladas en el presente documento generalmente debe continuarse durante un periodo de varias semanas a meses o años hasta que los títulos del virus alcanzan niveles aceptables, lo que indica que la infección se ha controlado o erradicado. Los pacientes que experimentan tratamiento con las combinaciones de fármaco desveladas en el presente documento pueden controlarse de forma rutinaria midiendo el ARN del virus de la hepatitis en el suero de los pacientes por técnicas slot-blot, dot-blot, o RT-PCR, o mediante la medición de antígenos virales de la hepatitis C, tales como antígenos de superficie, en suero para determinar la eficacia de la terapia. El análisis continuo de los datos obtenidos por estos procedimientos permite la modificación del régimen de tratamiento durante la terapia de modo que se administren cantidades óptimas de cada componente en la combinación, y de modo que también pueda determinarse la duración del tratamiento. Por tanto, el régimen de tratamiento/programa de dosificación puede modificarse de forma racionar durante el transcurso de la terapia de modo que se administren las cantidades más bajas de cada uno de los compuestos antivirales usados en combinación que juntos muestran eficacia satisfactoria anti-virus de la hepatitis C, y de modo que se continúe la administración de dichos compuestos antivirales en combinación sólo cuando sea necesario para tratar de forma satisfactoria la infección.

La presente invención abarca el uso de los inhibidores de serina proteasa de HCV desvelados en el presente documento en diversas combinaciones con los tipos anteriores y similares de compuestos que tienen actividad anti-HCV para tratar o prevenir infecciones por HCV en pacientes. Por ejemplo, puede usarse uno o más inhibidores de serina proteasa de HCV en combinación con: uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-HCV; uno o más compuestos que no son interferón que tienen actividad anti-HCV; o uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-HCV y uno o más compuestos que no son interferón que tienen actividad anti-HCV. Cuando se usan en combinación para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente humano, cualquiera de los inhibidores de serina proteasa de HCV desvelados en este momento y los compuestos anteriores que tienen actividad anti-HCV puede estar presente en una cantidad farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz. En virtud de sus efectos aditivos o sinérgicos, cuando se usan en las combinaciones descritas anteriormente, cada uno también puede estar presente en una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz, es decir, una cantidad que, si se usa en solitario, proporciona eficacia farmacéutica reducida en la completa inhibición o reducción de la acumulación de viriones de HCV y/o la reducción o mejora de las afecciones o síntomas asociados

con infección o patogénesis por HCV en paciente en comparación con dichos inhibidores de serina proteasa de HCV y compuestos que tienen actividad anti-HCV cuando se usan en cantidades farmacéuticamente eficaces. Además, la presente invención abarca el uso de combinaciones de inhibidores de serina proteasa de HCV y compuestos que tienen actividad anti-HCV como se ha descrito anteriormente para tratar o prevenir infecciones por HCV, donde uno o más de estos inhibidores o compuestos están presentes en una cantidad farmacéuticamente eficaz, y el otro u otros están presentes en una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz debido a sus efectos aditivos o sinérgicos. Como se usa en el presente documento, la expresión "efecto aditivo" describe el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos que es igual a la suma del efecto de cada agente dado en solitario. Un efecto sinérgico es uno en que el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos es mayor de la suma del efecto de cada agente dado en solitario.

Ejemplo 42

La actual terapia convencional para infección por virus de la hepatitis C (HCV) es tratamiento con el inmunomodulador alfa-interferón (Chronic Hepatitis C Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Esta terapia es ineficaz en la mayoría de los pacientes de HCV, que muestran ausencia de respuesta o recidiva incluso tras una terapia prolongada con interferón. Además, existen efectos secundarios severos asociados con terapia con interferón.

En vista de la apremiante necesidad de nuevos fármacos antivirales más eficaces para tratar a pacientes infectados por HCV, la presente invención ha desarrollado una serie de compuestos que inhiben la serina proteasa de HCV (un complejo de las proteínas virales NS3 y NS4A de HCV). Estos compuestos pueden usarse solos, junto con otro, y en combinación con otras clases de compuestos para tratar o prevenir la infección por HCV. Este ejemplo describe el ensayo de tres inhibidores representativos de serina proteasa de HCV, es decir, el compuesto CU, compuesto EP, y compuesto EC, solos y en combinación con miembros individuales de una serie de interferones (interferón alfa-2B (Schering-Plough), interferón alfa-2A (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), interferón beta (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ), e interferón tau ovino (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ)) en un ensayo de replicación de ARN subgenómico de HCV (ensayo de replicación) para determinar si los dos compuestos actúan en concierto para disminuir la acumulación de ARN de HCV. El ensayo de replicación mide la cantidad de ARN subgenómico de HCV (ARN de replicación) que permanece en las células de replicación (Lohmann y col. Science 285:110-113 (1999)) después de dos días de tratamiento con fármaco relativa a la cantidad de ARN de replicación en células no tratadas. En este ensayo, la potencia de los compuestos como fármacos antivirales de HCV es directamente proporcional al nivel de inhibición de acumulación de ARN de replicación.

Los dos fármacos se ensayan en combinaciones en el sistema de ensayo de replicación *in vitro* para determinar si, cuando se usan juntos, muestran actividad anti-HCV aditiva o sinérgica. El ensayo de replicación se emplea como modelo sustituto para infección *in vitro* por HCV para evaluar los efectos combinados del inmunomodulador, por ejemplo interferón-alfa 2B (Intron A; Schering Plough), y el inhibidor de serina proteasa de HCV, por ejemplo compuesto CU. Como se muestra a continuación, los resultados demuestran que existe un claro efecto anti-HCV sinérgico de estos dos tipos de fármacos medido usando determinaciones matemáticas formales de sinergia para analizar su capacidad de reducir los niveles de ARN de HCV en el ensayo de replicación.

El ensayo de replicación

El ensayo de replicación empleando una línea celular que contiene el ARN subgenómico auto-replicante (replicón) de HCV se describe en Lohmann y col. Science 285:110-113 (1999). El número de acceso a Genbank para la secuencia del replicón usado en los experimentos descrito en el presente documento se enumera en esta referencia como A1242654. Este artículo desvela procedimientos para la transcripción *in vitro* de ARN a partir del ADNc de replicón, la transfección del ARN de replicación en células Huh7 por electroporación, y la selección de células que contienen el ARN de replicación usando el antibiótico G418. Las células Huh7 son una línea celular de hepatoma obtenida del Dr. William Mason en Fox Chase Cancer Research Center (Filadelfia). Estas células están disponibles al público en Fox Chase, y se han descrito extensivamente en la bibliografía científica (Nakabayashi y col. Cancer Res. 42:3858-3863 (1982)). En los experimentos descritos en el presente documento, todo el ADN molde se retira de la preparación de ARN de replicación transcrito *in vitro* antes de la electroporación de este ARN en células Huh7 por tratamiento múltiple con DNasa (tres tratamientos secuenciales).

El ensayo de replicación se realiza como se describe en detalle a continuación. En resumen, se colocan células de replicación en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo y se incuban a 37°C. Las células se incuban en DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina, aminoácidos no esenciales, y el antibiótico G418 (0,25 mg/ml). Después de incubación durante una noche, se reemplaza el medio con DMEM que contiene suero bovino fetal al 2% y diversas concentraciones del inhibidor de serina proteasa, tal como compuesto CU, y/o un interferón tal como interferón-alfa 2B (Intron A, Schering Plough). Cada compuesto se ensaya en seis a ocho concentraciones diferentes. Para un extremo del intervalo de concentraciones, se seleccionan elevadas concentraciones de los compuestos que provocarán la inhibición casi completa de la acumulación de ARN de replicación después de dos días de tratamiento. A partir de estas concentraciones de partida, se hacen diluciones en serie de modo que los intervalos de concentración ensayados en el ensayo de replicación incluyan concentraciones a las que los compuestos son altamente eficaces, así como

- concentraciones a las que no existe efecto significativo. Cada concentración de inhibidor de serina proteasa de HCV se ensaya sin ninguna interacción añadida, así como con la adición de seis a ocho dosis diferentes de interferón. Asimismo, se ensaya interferón sin ningún inhibidor de serina proteasa de HCV añadido. Después de una incubación de 48 horas con los compuestos, se retira el medio de las placas, y se extrae el ARN celular total de las células usando el kit RNeasy-96 fabricado por Qiagen Inc. (Valencia, CA). Este ARN después se analiza por RT-PCR cuantitativa, o TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City CA). La diana de RT-PCR TaqMan® es el gen de resistencia a neomicina en el ARN de replicón. Las placas se configuran de tal modo que haya 5 réplicas de cada muestra de tratamiento de fármaco, y 16 réplicas de las muestras sin tratar. Esto permite una mayor confianza estadística en los datos de RT-PCR cuantitativa.
- El análisis de los datos del ensayo de replicón produce dos valores que son útiles para evaluar la potencia de los agentes antivirales potenciales de HCV. A cada concentración de compuesto ensayada, se determina el nivel de inhibición en la acumulación de ARN de replicón causada por el compuesto durante dos días de tratamiento relativa a la cantidad de ARN de replicón en células no tratadas. Esto se presenta como porcentaje de inhibición. Cuando se ha obtenido una serie de datos puntuales generados por los tratamientos de las células a un intervalo de concentraciones, se generan los valores de CI_{50} , es decir, la concentración de compuesto a la cual se disminuye la acumulación de ARN de replicón de HCV en un 50% por el compuesto. A través del ensayo repetido de los inhibidores de serina proteasa de HCV en el ensayo de replicón, se determina que el CI_{50} tiene un coeficiente de variación porcentual (%CV o $100\% \times \text{derivación típica en } CI_{50}/\text{media} = CI_{50}$) de aproximadamente el 20%. El CI_{50} es el valor usado para clasificar los compuestos individuales ensayados en este ensayo en base a su potencia como agentes antivirales de HCV. Las determinaciones simples de CI_{50} son inadecuadas para evaluar la utilidad de los compuestos usados en combinación. El análisis más eficaz de la serie de datos generada usando todas las combinaciones de diferentes interferones e inhibidores de serina proteasa requiere la evaluación de los porcentajes de inhibición como se muestra en la Tabla 7 usando procedimientos matemáticos descritos a continuación que están diseñados para determinar si los tratamientos de combinación son agonistas, aditivos, o sinérgicos.
- Los detalles del ensayo de replicón son los siguientes:

Procedimiento para el análisis cuantitativo del ARN de replicón de HCV en el ensayo de replicón de HCV usando ®RT-PCR TaqMan®

- El ensayo de replicón se usa para medir la capacidad de compuestos potenciales antivirales de HCV de inhibir la acumulación de moléculas de replicón de ARN subgenómico de HCV en una línea celular Huh7 (Lohmann y col. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). Este ensayo comprende tres componentes operativos: (1) el mantenimiento de la célula de replicón, la configuración de la placa de ensayo, y la aplicación de los compuestos; (2) la extracción del ARN celular total desde las células de replicón; y (3) RT-PCR (TaqMan®) a tiempo real para medir la cantidad de ARN de replicón en cada muestra. El ensayo de replicón requiere al menos 4 días para realizarse; sin embargo, el proceso puede interrumpirse y congelarse las muestras entre las etapas. Cada componente del ensayo se describe a continuación.

1. Mantenimiento de la célula de replicón, configuración de la placa de ensayo, y aplicación del compuesto

1.1 Mantenimiento de la línea celular de replicón

- La línea celular usada en el ensayo de replicón se produce como se describe en Lohmann y col. (Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). Después de incubar matraces de cultivo celular de 150 cm² (Costar) que contienen células de replicón a 37°C y CO₂ al 5% y de que lleguen a ser confluentes, las células se diluyen 1:10, v/v, en matraces de cultivo celular de 150 cm² nuevos. El medio es DMBM que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), aminoácidos no esenciales (NEAA) 1X, Glutamina (Glu) 1X, y 0,25 mg/ml de G418. Se realizan tres pases en serie, permitiendo cada vez que las células lleguen a ser confluentes, seguido de dilución de las células en matraces de cultivo celular de 150 cm² nuevos. Estas células, mencionadas como "células originales", después se reparten en alícuotas y se almacenan para su futuro uso en el ensayo de replicón. Se realiza el análisis basado en TaqMan® para determinar la cantidad de genomas de replicón de HCV por célula, que revela la presencia de ~150 copias del replicón por célula. Esto se basa en la proporción de copias de ARN de replicón a dos veces las copias de la cantidad de gen humano apoB de genomas haploides).

- 1.1.1. Las células originales se almacenan en N₂ líquido. Para células usadas en el ensayo de replicón, después de 20 pases en serie, se abandonan las células, y se revive un lote nuevo del almacenamiento en N₂ líquido.

1.2 Siembra de células en placas de 96 pocillos para el ensayo de replicón

- 1.2.1. Para la preparación de placas de 96 pocillos, se trata con tripsina una matraz de 75 cm² del 75% de confluencia de células que contienen replicón, y se resuspenden en 10 ml de medio A. El tratamiento con tripsina se realiza retirando el medio, añadiendo 1 ml de tripsina-EDTA al 0,25%, p/p, y después retirando la tripsina-EDTA. Después de 5-10 minutos, las células se liberan del matraz y se resuspenden en medio.
- 1.2.2. Las células se cuentan usando un hemacitómetro, y la concentración celular se ajusta a 10⁵ células/ml.
- 1.2.3. Cada pocillo se siembra con una suspensión celular de 100 µl usando una pipeta multi-canal Impact2 (Matrix), no sembrando nunca más de cuatro placas de 96 pocillos a partir de una única suspensión celular.

1.2.4. Las placas de 96 pocillos se incuban a 37°C durante una noche.

1.3 Dilución del compuesto y aplicación a placas de células de replicón

- 5 1.3.1. Se disuelven compuestos inhibidores de serina proteasa de HCV en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 20 mM. Los interferones se suspenden en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina sérica bovina al 0,1% p/v.
- 1.3.2. La solución 20 mM de compuesto se diluye hasta 1mM con DMSO.
- 1.3.3. Se añaden 50 µl de compuesto disuelto en DMSO a 10 ml de medio B (la concentración del compuesto es 5 mM, y la concentración de DMSO es ahora del 0,5%), o se añaden 20 µl de compuesto 1 mM y 30 µl de DMSO a 10 ml de medio B (la concentración del compuesto es 2 µM.)
- 10 1.3.4. La dilución del compuesto hasta la concentración final se completa mezclando la solución de compuesto/medio B con medio C (contiene DMSO al 0,5%). Las diluciones en serie uno a cinco del compuesto se hacen con medio C en un bloque de 96 pocillos de polipropileno de 2 ml para obtener las concentraciones finales deseadas del compuesto.
- 15 1.3.5. La placa celular se retira del incubador a 37°C y se marca en la esquina superior derecha de la tapa y el lado derecho de la base. El medio se retira vertiéndolo de las placas de 96 pocillos.
- 1.3.6. Se añaden 100 µl de las soluciones de compuesto/medio de cada pocillo del bloque de dilución de 96 pocillos a la placa celular de 96 pocillos usando una pipeta Impact2.
- 20 1.3.7. Se añaden 100 µl de medio C a todos los pocillos no tratados de acuerdo con la Tabla 3 para ensayar los compuestos a 1, 3, ó 6 diferentes concentraciones. "Untx" se refiere a células con tratamiento simulado (DMSO añadido a la misma concentración que en células tratadas); "Con." se refiere a concentración del compuesto.

TABLA 3

2 compuestos, 6 concentraciones, 5 réplicas

	Compuesto 1						Compuesto 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx
B		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1
C		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2
D		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3
E		con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4
F		con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5
G		con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6
H		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx

4 compuestos, 3 concentraciones, 5 réplicas

	Compuesto 1						Compuesto 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
C		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
D		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
E		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
F		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
G		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
H		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
		Compuesto 3						Compuesto 4					

(continuación)

16 compuestos, 1 concentración, 4 réplicas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	comp 1	comp 2	comp 3	comp 4	comp 5	comp 6	comp 7	comp 8	untx	
B		untx	comp 1	comp 2	comp 3	comp 4	comp 5	comp 6	comp 7	comp 8	untx	
C		untx	comp 1	comp 2	comp 3	comp 4	comp 5	comp 6	comp 7	comp 8	untx	
D		untx	comp 1	comp 2	comp 3	comp 4	comp 5	comp 6	comp 7	comp 8	untx	
E		untx	comp 9	comp 10	comp 11	comp 12	comp 13	comp 14	comp 15	comp 16	untx	
F		untx	comp 9	comp 10	comp 11	comp 12	comp 13	comp 14	comp 15	comp 16	untx	
G		untx	comp 9	comp 10	comp 11	comp 12	comp 13	comp 14	comp 15	comp 16	untx	
H		untx	comp 9	comp 10	comp 11	comp 12	comp 13	comp 14	comp 15	comp 16	untx	

12 compuestos, 1 concentración, 5 réplicas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		comp 1	comp 1	comp 1	comp 1	comp 1	comp 7	comp 7	comp 7	comp 7	comp 7	
C		comp 2	comp 2	comp 2	comp 2	comp 2	comp 8	comp 8	comp 8	comp 8	comp 8	
D		comp 3	comp 3	comp 3	comp 3	comp 3	comp 9	comp 9	comp 9	comp 9	comp 9	
E		comp 4	comp 4	comp 4	comp 4	comp 4	comp 10	comp 10	comp 10	comp 10	comp 10	
F		comp 5	comp 5	comp 5	comp 5	comp 5	comp 11	comp 11	comp 11	comp 11	comp 11	
G		comp 6	comp 6	comp 6	comp 6	comp 6	comp 12	comp 12	comp 12	comp 12	comp 12	
H		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	

1.4. Las placas se incuban durante 48 horas a 37°C, y después se someten a extracción de ARN.

5

TABLA 4

Resumen del equipo y suministros usados para la configuración del cultivo celular y compuesto		
pipeta Impact2 de 8 canales, 1250 µl	nº cat. 2004	Matrix
bloque de pocillos profundos de polipropileno de 2 ml, 96 pocillos, estéril	nº cat. 4222	Matrix
depósitos de reactivo de 25 ml, estériles	nº cat. 8096	Matrix
puntas de pipeta X-tra largas de 1250 µl	nº cat. 8255	Matrix
placa de 96 pocillos	nº cat. 3595	Costar
Hemocitómetro	Bright line mejorado Neubauer profundidad 0,1 mm	Reichertt
DMEM	nº cat. 51444-79P	IRH
L-glutamina (Glu)	nº cat. 12403-010	GIBCO-BRL
aminoácidos no esenciales (NEAA)	nº cat. 11140-050	GIBCO-BRL
suero bovino fetal (FBS)	nº cat. 16250-078	GIBCO-BRL
G418	nº cat. 55-0273	Invitrogen

(continuación)

DMSO	n° cat. D-2650	Sigma
medio A	DMEM, FBS al 10%, NEAA 1X, Glu 1X, 0,25 mg/ml de G418	
medio B	DMEM, FBS al 2%, NEAA 1X, Glu 1X	
medio C	DMEM, FBS al 2%, NEAA 1X, Glu 1X, DMSO al 0,5%	
tripsina- EDTA 0,25%	GIBCO-BRL	

Extracción del ARN celular total de las células de replicón**2.1 Introducción**

5 El objetivo del procedimiento es extraer el ARN de muestras de cultivo tisular *in vitro* de modo que el ARN vital o celular se recupere cuantitativamente y suficientemente puro para analizarlo por ensayo de RT-PCR cuantitativa de HCV.

10 Para permitir la detección de variaciones en la eficacia de la extracción del ARN, se añaden cantidades convencionales de virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), un virus ARN con alguna similitud con HCV, a cada muestra celular antes de la extracción del ARN. Por tanto, el nivel de ARN de BVDV detectado en la reacción combinada final de RT-PCR debe ser constante entre todos los pocillos dentro de los límites de variabilidad asociados con el ensayo de replicón. Este control interno de eficacia de extracción del ARN se analiza adicionalmente en la sección TaqMan®, a continuación.

15 El enfoque de extracción de ARN usado es el procedimiento RNeasy-96 fabricado por Qiagen Inc. (Valencia, CA). Este procedimiento emplea 96 minicolumnas basadas en sílice que se posicionan en una serie compatible con operaciones de cultivo tisular de 96 pocillos. La tecnología de extracción de ARN es una modificación del procedimiento de Boom, en que todas las proteínas y ácidos nucleicos celulares, incluyendo las nucleasas, se desnaturalizan primero con una fuerte sal caotrópica (tiocianato de guanidinio). En este entorno, los ácidos nucleicos tienen una fuerte afinidad por la sílice, el material en los discos de mini-columna; sin embargo, las proteínas y otros contaminantes no se unen a la sílice, y pasan a través de las columnas. Después de lavar las columnas con 20 soluciones caotrópicas/etanol, las muestras se secan parcialmente, y entonces se libera el ácido nucleico de la columna en un pequeño volumen de agua.

25 Para reducir la variabilidad en la recuperación del ARN de HCV, se tiene cuidado con las condiciones de lavado y secado parcial de la columna. La presencia de una pequeña cantidad de etanol en una columna contaminaría el ARN final e interferiría con el sistema de detección de RT-PCR. Se requiere precaución en todas las fases de este procedimiento porque las muestras de partida pueden ser biopeligrosos, la sal caotrópica es altamente cáustica, y en cuanto al tiocianato, puede generar gas cianuro tóxico si se deja entrar en contacto con entornos ácidos.

TABLA 5

Resumen del equipo y suministro necesarios para los procedimientos de extracción del ARN de HCV		
Kit RNeasy 96 (24)	n° cat. 74183	Qiagen
Colector QIAvac 96	n° cat. 19504	Qiagen
Centrífuga 4-15C, para 2x96 placas, 6000 x g	n° cat. 81010	Qiagen
Rotor de placa para 2x96 placas	n° cat. 81031	Qiagen
Alcohol etílico 200 Proof		
Pipeta Impact2 de 8 canales, 250 µl	n° cat. 2002	Matrix
Pipeta Impact2 de 8 canales, 1250 µl	n° cat. 2004	Matrix
Bloque de pocillos profundos de polipropileno de 2 ml, 96 pocillos, estéril	n° cat. 4222	Matrix
Depósitos de reactivo de 25 ml, estériles	n° cat. 8096	Matrix
Puntas de pipeta X-tra largas de 1250 µl	n° cat. 8255	Matrix
Puntas de pipeta de 200 µl	n° cat. 7275	Matrix
Medio MEM sin suero	n° cat. 11095-80	GIBCOBRL

2.2. Procedimiento:

2.2.1. Lisis celular

2.2.1.1. Se prepara el tampón de lisis: Para una placa de 96 pocillos, se añaden 150 µl de β-mercaptoetanol (β-ME) y 1 µl de solución madre de BVDV (agitación con vórtice de la solución madre antes de añadirla) a 15 ml de tampón RLT (un componente del kit RNeasy, Qiagen). Esta solución madre se prepara infectando células MDBK (células renales bovinas, nº CCL-22, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas VA) con BVDV y recogiendo el cultivo en el máximo efecto citopático (CPE). Esta solución madre tiene un título infeccioso de aproximadamente 1×10^7 pfu/ml. Esto da al BVDV un ciclo umbral (C_t) de aproximadamente 22 en el ensayo TaqMan®. La solución madre de BVDV se almacena en un congelador a -80°C.

2.2.1.2. Las células se lavan con 150 µl de medio MEM sin suero (programa 4 en la pipeta electrónica de 8 canales P1250: Carga 1250, Disp. 150 x 8). Se añaden 150 µl de tampón de lisis a cada pocillo (mismo programa).

2.2.1.3. El ARN se extrae inmediatamente, o se congelan las células a -80°C.

2.2.2. Preparación de reactivos y materiales para la extracción de ARN.

2.2.2.1. Se anota el nº de lote del RPE y el kit RNeasy 96.

2.2.2.2. RPE: se añaden 720 ml de etanol al 100 % a un frasco de RPE (Qiagen), y se mezclan bien; los frascos de RPE siempre se agitan bien antes de su uso.

2.2.2.3. Etanol al 70%: se añaden 150 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) y agua a 350 ml de etanol al y se mezclan bien.

2.2.3. Preparación de ARN con el kit RNeasy 96

2.2.3.1. Se descongelan las muestras congeladas a temperatura ambiente durante 40 min. Al mismo tiempo, se descongela una columna de controles de extracción para cada placa (controles de extracción. Los controles de extracción de RNeasy son una serie de 8 tubos todos conectados juntos. Dentro de cada tubo hay 170 µl de lisado celular con una cierta proporción de células HCV positivas y negativas. Desde la parte superior hasta el fondo hay dos de cada uno de controles de número bajo, medio, alto, y cero, respectivamente. (Véase la sección 2.3 del protocolo a continuación.)

2.2.3.2. Las muestras se mezclan pipeteando 100 µl arriba y abajo cinco veces. La muestra completa se transfiere a las columnas 1-10 del bloque de pocillos cuadrados Matrix de 2 ml (programa 1 en P250: Mezcla 100 x 5, Carga 170, Purga).

2.2.3.3. Se transfieren 150 µl del patrón de replicón a la columna 11 (sin muestras en la columna 12).

2.2.3.4. Se añaden 150 µl de etanol (ETOH) al 70% a cada muestra (programa 4 en P1250: Carga 1250, Disp. 150).

2.2.3.5. Se coloca una placa RNeasy 96 marcada con el número de placa apropiado en el colector de vacío. Se mezcla y transfiere el lisado/ETOH a la placa RNeasy 96 (programa 1 en P1250: Mezcla 200, Veces 5, Carga 330, y Purga). Se precinta cualquier pocillo no usado con cinta transparente (suministrada por Qiagen), habitualmente la columna 12.

2.2.3.6. Se aplica vacío (aproximadamente 800 mbar) para cargar la muestra en las mini-columnas.

2.2.3.7. La placa RNeasy-96 se lava con 1000 µl de tampón RW1 (Qiagen)/pocillo (programa 2 en P1250: Carga 1000, Disp. 1000).

2.2.3.8. Se aplica vacío al filtro a través del tampón RW1; y se vacía el flujo directo.

2.2.3.9. Se lava la placa RNeasy-96 con 1000 µl de tampón RFE/pocillo (programa 2 en P1250).

2.2.3.10. Se aplica vacío al filtro a través del tampón RPE.

2.2.3.11. Se repite la etapa 2.2.3.9.

2.2.3.12. Se aplica vacío al filtro a través del tampón RPE, manteniendo el vacío aplicado durante 3 min.

2.2.3.13. Se seca la placa RNeasy 96: La placa RNeasy-96 se coloca en una gradilla de microtubos de recogida (suministrada por Qiagen), se cubre con la cinta AirPore suministrada, y se centrifuga la unidad durante 10 min. a 6000 x g (centrífuga Qiagen Sigma; 4-15°C).

2.2.3.15. Se eluye el ARN de la placa RNeasy de 96 pocillos; la placa RNeasy-96 se transforma en la parte superior de una nueva gradilla de microtubos de recogida. Se añaden 70 µl de agua sin RNasa al centro de cada pocillo (programa 3 en P1250; Carga 850, Disp. 70).

2.2.3.16. Se incuba 1 min. a temperatura ambiente, y después se coloca una nueva cinta AirPore sobre la placa.

2.2.3.17. La unidad entonces se centrifuga durante 4 min. a 6000 x g en una centrífuga Sigma 4-15C. El volumen eluido mide entre 28 µl y 50 µl.

2.2.3.18. Se desecha la placa RNeasy-96, y la gradilla de tubos de recogida se precinta con las tapas proporcionadas por Qiagen (8 por tira).

2.2.3.19. El ARN eluido se almacena a -80°C o se analiza inmediatamente en el ensayo TaqMan®.

2.3 Preparación de controles de extracción**Día 1**

2.3.1.1. Se siembran 25×10^7 células productoras de replicón en un matraz de cultivo tisular de 150 cm^2 (T-150).

2.3.1.2. Se siembran $2,0 \times 10^6$ células Huh7 en un matraz de cultivo tisular de 75 cm^2 (T-75).

2.3.1.3. Se incuban durante una noche a 37°C .

5 Día 2

2.3.1.4. Se lisan las células con tampón de lisis.

2.3.1.5. Se retira el sobrenadante de las células Huh7 y productoras de replicón, y se lava la monocapa con 10 ml de medio sin suero (MEM).

10 2.3.1.6. Se añaden 30 ml de tampón de lisis (con $1 \mu\text{l}$ de solución madre de BVDV/15 ml de tampón de lisis) a las células Huh7, se mezclan por pipeteo repetido, y se coloca el lisado celular en un tubo de centrifuga de cultivo tisular con fondo cónico de 50 ml.

2.3.1.7. Se añaden 10,5 ml de tampón de lisis a las células productoras de replicón, se mezclan por pipeteo repetido, y se coloca el lisado celular en un tubo de centrifuga de cultivo tisular de fondo cónico de 15 ml.

15 2.3.2. Para el patrón de extracción ALTO: Se alicuotean $170 \mu\text{l}$ del lisado celular de las células productoras de replicón en las filas 5 y 6 de dos gradillas de tubos de $0,75 \text{ ml}$ Matrix.

2.3.3. Para el patrón de extracción MEDIO: Se añade $1,0 \text{ ml}$ del lisado celular de las células productoras de replicón a 9 ml del lisado Huh7, y se mezclan bien. Se alicuotean $170 \mu\text{l}$ de esta mezcla a las filas 3 y 4 de dos gradillas de tubos de $0,75 \text{ ml}$ Matrix.

20 2.3.4. Para el patrón de extracción BAJO: Se añaden $50 \mu\text{l}$ del lisado celular de las células productoras de replicón a 10 ml del lisado Huh7, y se mezclan bien. Se alicuotean $170 \mu\text{l}$ de esta mezcla a las filas 1 y 2 de dos gradillas de tubos de $0,75 \text{ ml}$ Matrix.

2.3.5. Control de extracción CERO: Se alicuotean $170 \mu\text{l}$ del lisado celular Huh7 a las filas 7 y 8 de dos gradillas de tubos de $0,75 \text{ ml}$ Matrix.

2.3.6. Se almacenan los controles a -80°C .

25 **3. RT-PCR TaqMan® y análisis de datos**

3.1 **Introducción:** Se usa RT-PCR cuantitativa a tiempo real para medir la cantidad de ARN de replicón de HCV en cada muestra. Esta tecnología también se menciona como ensayo de 5' nucleasa basado en PCR, y TaqMan®. El instrumento analítico es el sistema de detección de secuencia 7700 Prism de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este instrumento es esencialmente un espectrógrafo de fluorescencia inducida por láser combinado en el tiempo acoplado con un termociclador. Controla la acumulación del amplicón de PCR en cada pocillo de una placa de muestra de 96 pocillos durante todo el transcurso del proceso de PCR.

35 3.2 **Uso del control interno de BVDV:** Como se han mencionado en la sección previa, se incorpora un control positivo interno en cada muestra. Esto sirve como medida de la eficacia de extracción del ARN, y muestra si la muestra contiene contaminantes que inhiben la PCR TaqMan®. El BVDV se mezcla con el tampón de lisis celular caotrópico antes de aplicar el tampón de lisis a las células. Aunque el control positivo está en cada muestra, el ensayo del control positivo interno de BVDV se realiza solamente cuando los datos del ensayo de ARN de replicón de HCV caen fuera de los límites esperados, sugiriendo que podría haber un problema con las muestras. El 7700 es capaz de controlar simultáneamente la acumulación de dos amplicones diferentes de PCR en el mismo tubo usando sondas de detección marcadas con dos diferentes colorantes indicadores fluorescentes ("combinación"). Los criterios específicos que provocan un análisis TaqMan® para el control positivo interno de BVDV de una placa de muestra se describen en la sección sobre el análisis de datos (3.6).

40 45 3.3 **Sonda y cebadores de TaqMan® del ARN de replicón de HCV.** A causa de la estabilidad genérica esperada y la ausencia general de estructura secundaria del ARN en el gen de resistencia a neomicina (neo) codificado en el replicón, se emplean cebadores y una sonda que se unen en esa región. Este segmento del ARN de replicón se extiende desde las bases 342-1193 del replicón de 8001 pares de bases (SEC ID N° 1):

```

301 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac
361 ctcaaagaaa aaccaaactt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc
421 acgcagggtt ccgggcccgt tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga
481 caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt
541 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggtat
601 cgtggctggc cacgacgggc gttccttggc cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg
661 gaaggggact gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg
721 ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gggctgcat acgcttgatc
781 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga
841 tggaaagcgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcag
901 ccgaactggt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacc
961 atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg CCGCTTTCT GGATTCACG
                                                    cebador directo
1021 aCTGTGGCCG CCGTGGTGTG Gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata
           Sonda TaqMan®
1081 ttgctgaaga gCTTGGCCG CAATGGGctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg
           Cebador inverso
1141 ctcccgattc gcagcgcate gecttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa
    
```

3.4 Procedimientos

3.4.1. Procedimiento para preparar mezclas maestras 1x para RT-PCR de NEO y BVDV

TABLA 6

Resumen del equipo y suministros para preparar la mezcla maestra de 10 placas de RT-PCR

Equipo y suministros	Nº de orden	Proveedor
pipeta de 0,5-10 µl	serie 22 47 005-1 2000	Eppendorf
pipeta de 2-20 µl	serie 22 47 015-9 2000	Eppendorf
pipeta de 10-100 µl	serie 22 47 020-5 2000	Eppendorf
pipeta de 50-200 µl	serie 22 47 025-6 2000	Eppendorf
pipeta de 100-1000 µl	serie 22 47 030-2 2000	Eppendorf
puntas Matrix de 1250 µl	nº cat. 8255	Matrix
puntas Matrix de 200 µl	nº cat. 7275	Matrix
puntas ART de 10 µl	nº cat.2140	Molecular Bioproducts
puntas ART de 20 µl	nº cat. 2149P	Molecular Bioproducts
puntas ART de 100 µ	nº cat.2065E	Molecular Bioproducts
puntas ART de 200 µl	nº cat.2069	Molecular Bioproducts
puntas ART de 1000 µl	nº cat.2079E	Molecular Bioproducts
Pipeta electrónica, Impact2	nº cat.2001	Matrix
tubos de Microfusa sin RNasa de 1,5 ml	nº cat.12450	Ambion
tubos de polipropileno de 14 ml	nº cat.352059	Falcon
depósito de reactivo de 25 ml	nº cat.8096	Matrix
placa de reacción de 96 pocillos	nº cat. N801-0560	Applied Biosystems
tiras de tapa óptica	nº cat. N801-0935	Applied Biosystems
Coronas estériles desechables	nº cat.9515-E	Baxter

(continuación)

Reactivos	Nº de orden	Proveedor
Ácido	HCl 0,1 N	Fisher
RNAsaZap	nº cat. 9780	Ambion
RNAsa away	nº cat. 7005	Molecular Bioproducts
10-pak, kit de reactivos centrales de EZ RT-PCR, tampón de reacción 5x, acetato de manganeso 25 mM, desoxi NTP	nº cat. 403028	Applied Biosystems
sonda VIC NEO, 2 µM (=10x), 550 µl por alícuota	nº cat. 450003, personalizado, 5'-VIC-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRA -3' (SEC ID Nº 2)	Applied Biosystems
sonda VIC BVDV, 2 µM (=10x), 550 µl por alícuota (Vertex)	nº cat. 450003, personalizado, 5'-VIC-CCC TCG TCC ACG TGG CAT CTC GA-TAMRA -3'(SEC ID Nº 3)	Applied Biosystems
cebador directo NEO, 3 µM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 µl por alícuota	nº cat. 4304972, personalizado, 5'-CCG CTT TTC TGG ATT CAT CG-3' (SEC ID Nº 4)	Applied Biosystems
cebador inverso NEO, 3 µM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 µl por alícuota	nº cat. 4304972, personalizado, 5'-CCC ATT CGC CGC CAA-3'(SEC ID Nº 5)	Applied Biosystems
cebador directo BVDV, 3 µM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 µl por alícuota	personalizado, 5'-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-3' (SEC ID Nº 6), escala 1,0 µM con purificación en gel	Oligos etc
cebador inverso BVDV, 3 µM (=10x) mezcla de cebador directo/inverso, 550 µl por alícuota	personalizado, 5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEC ID Nº 7), escala 1,0 µM con purificación en gel	Oligos etc
patrones de ARN NEO	ARN transcrito <i>in vitro</i> de un plásmido que contiene la parte del gen neo del ARN de replicón de HCV usando la ARN polimerasa T7. El ARN transcrito <i>in vitro</i> se cuantifica en base al peso molecular conocido de los transcritos y la absorbancia UV de la solución de transcrito purificado. Este ARN se diluye, alícuotea, y almacena a -80°C. Las alícuotas individuales se descongelan para cada ensayo TaqMan®.	
muestras de ARN a ensayar aisladas de células de replicón de HCV (sección 2 de este protocolo), 10 µl/placa de 96 pocillos		
agua sin nucleasa (no tratada con DEPC)	nº cat. 9930	Ambion

3.4.2. Preparación de reactivos para la mezcla maestra

5 3.4.2.1. Se limpia la poyata de acuerdo con las dos siguientes etapas, y se limpian las pipetas con RNAsa away. RNAsa Zap (Ambion, Austin, TX)
RNAsa Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA)

10 3.4.2.2. Se abren los reactivos centrales de EZ RT-PCR (Applied Biosystems) y se pone el tampón 5x en hielo, se descongelan los reactivos congelados a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, y después se ponen en hielo. Puede usarse un kit de reactivos EZ RT-PCR para analizar dos extracciones de ARN de 96 pocillos.

3.4.2.3. Se coge un tubo de sonda VIC de 2 µM (NEO o BVDV, 550 µl por tubo) de -20°C y se pone en hielo.

3.4.2.4. Se toma un tubo de mezcla de cebador directo/inverso de 3 μM (NEO o BVDV, 550 μl por tubo) de -20°C y se pone en hielo.

3.4.2.5. Se coge un tubo (30 μl) de patrones de transcrito de ARN (10^8 copias/10 μl) de -80°C y se pone en hielo.

3.4.2.6. Se coge un tubo de agua Ambion a temperatura ambiente.

5 **3.4.3. Ensamblaje de la mezcla maestra para una reacción de placa de 96 pocillos.**

3.4.3.1. Se usa una pipeta de 1 ml para transferir tampón 5x (Applied Biosystems) a un tubo de 14 ml; el volumen total añadido es 1100 μl .

3.4.3.2. Se usa una pipeta de 1 ml para añadir $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ 25 mM (Applied Biosystems) a un tubo de 14 ml; el volumen total añadido es 660 μl .

10 3.4.3.3. Se usa una pipeta de 200 μl para añadir 165 μl de dATP 10 mM al tubo de 14 ml. Se hace lo mismo para dCTP 10 mM, dUTP 20 mM, y dGTP 10 mM.

3.4.3.4. Se usa una pipeta de 1 ml para añadir 550 μl de mezcla de cebador directo/inverso $10 \times 3 \mu\text{M}$.

3.4.3.5. Se usa una pipeta de 1 ml para añadir 550 μl de sonda $10 \times 2 \mu\text{M}$.

15 3.4.3.6. Se usa una pipeta de 1 ml para añadir 220 μl de ADN polimerasa *rTth* (Applied Biosystems).

3.4.3.7. Se usa una pipeta de 100 μl para añadir 55 μl de AmpErase UNG (Applied Biosystems).

3.4.3.8. Se usa una pipeta de 1 ml para añadir 605 μl de H_2O Ambion al tubo de 14 ml; el volumen final es 4400 μl en total.

3.4.3.9. Se transfieren los 4400 μl de mezcla maestra a un depósito de reactivo de 25 ml.

3.4.3.10. Se distribuyen 40 μl por pocillos para los 96 pocillos usando una pipeta de 8 canales.

20 3.4.3.11. Se transfieren 10 μl de muestras desconocidas extraídas a los pocillos de la placa de reacción usando una pipeta de 8 canales, columna por columna, columna 1 a columna 11. Se tapa cada columna después de la transferencia.

3.4.3.12. Se añaden 270 μl de H_2O Ambion a los 30 μl de 10^8 copias/10 μl de transcrito de ARN para su uso en la curva patrón y se mezclan. Ahora hay 10^7 copias del ARN patrón de cuantificación del replicón de HCV/10 μl .

25 **3.4.4. Ajuste del ABI 7700 para cada ejecución**

3.4.4.1. Antes de cada ejecución, se reinicia el ordenador para el ABI 7700 y se restablece el escritorio.

3.4.4.2. Se cierra y elimina cualquier programa redundante del disco duro; se arrastran los datos a la papelera.

3.4.4.3. Se abre el programa Sequence Detector v1.7 (software SDS).

3.4.4.4. Se abre la carpeta "ejecuciones del ensayo de replicón".

30 3.4.4.6. Se abre la bandeja de plantillas del "ensayo de replicón". Las condiciones del termociclador programadas en la plantilla son las siguientes:

Fase 1: 50°C durante 2 min.

Fase 2: 60°C durante 30 min.

Fase 3: 95°C durante 5 min.

35 Fase 4: 95°C durante 15 s.

Fase 5: 60°C durante 60 s.

Cantidad de repeticiones de ciclo de las fases 4-5: 40.

Instrumento de plantilla: diagnóstico: opciones avanzadas:

Seleccionar vistas: presentar mse

40 Seleccionar vistas: presentar mejor ajuste.

Seleccionar varios: colorante de referencia ROX.

3.4.4.7. Se "guarda" (no "guarda como") el archivo en la carpeta de "ejecuciones del ensayo de replicón".

3.4.4.8. Se abre el menú: clicar EJECUCIÓN

3.5 Preparación de los datos de ABI7700 después de una ejecución usando el software SDS.

45 3.5.1. Las placas de ensayo se retiran del ABI7700 y se desechan sin haberse abierto. Esto reduce enormemente los problemas de laboratorio con la contaminación cruzada de PCR.

3.5.2. Los datos se analizan usando el software Sequence Detector System V1.7.

3.5.3. Los niveles umbral se ajustaron inicialmente usando ajustes por defecto.

50 3.5.4. Criterios de rechazo de datos: Pueden rechazarse datos puntuales o series de placas completas. Si ha habido una desviación significativa del protocolo, fallo con el reactivo o accidente, o un fallo de ejecución de ABI 7700, pueden descartarse los datos. Para rechazar cualquier dato puntual de una ejecución aparentemente normal, debe cumplirse uno o más de estos criterios

3.5.4.1. Cálculos de ciclo umbral. Normalmente se usan los valores por defecto para el software SDS. Si el Ct de la muestra más concentrada es menor de 15, entonces se cambia el límite de parada del valor umbral según sea necesario a un valor inferior de modo que el Ct de la muestra de concentración más elevada sea mayor del valor de parada. Se actualizan los cálculos después de hacer este cambio.

55 3.5.3.2. Se considera rechazar una ejecución TaqMan® anormal completa indicada por una desviación de los

valores medios para la pendiente y el punto de corte en el eje y de la curva generada por el análisis de los patrones de ARN neo. Los intervalos para esos valores son:

Los valores de pendiente deben estar entre 3,0 y 3,6

Los ciclos de corte con y debes estar entre 36 y 41 ciclos.

5 3.5.4.3. Pueden eliminarse pocillos TaqMan® individuales aberrantes indicados por un extremo $R_n/\Delta R_n$ antes del análisis de los datos de modo que no afecten a los cálculos del software SDS.

3.5.4.4. Se examinan y registran los valores de Ct. De control no plantilla y se confirma que son $>7,0$ Ct ($>100X$) mayores que el Ct para cualquier muestra tratada con compuesto.

3.5.5. Los valores Ct de los patrones de ARN de HCV se comparan con resultados previos.

10 3.5.6. La curva patrón de ARN de HCV se compara con resultados previos.

3.5.7. Si es evidente una amplificación aberrante en pocillos individuales, se identifican y anotan esos pocillos.

3.5.8. Se exporta el archivo de "resultados" y se transfiere del ordenador 7700 a otro ordenador para su análisis usando Microsoft Excel.

3.5.9. Se informa de cualquiera de los siguientes cambios en las preparaciones de reactivo o la dilución usadas.

15 Nueva síntesis de sonda o cebador del vendedor.

Nueva dilución y alícuotas de sonda o cebador.

Nueva preparación de patrones de transcrito de ARN.

Nueva dilución y alícuotas de patrones de transcrito de ARN.

Nueva preparación viral de BVDV.

20 Nueva preparación de patrones de columna 11.

3.6 Análisis de datos TaqMan®.

3.6.1. Se copia y pega el número Ct y el número de copias de HCV TaqMan® desde el archivo de resultados de TaqMan® en las celdas apropiadas de la macro de Microsoft Excel de análisis de datos del ensayo de replicón, y se ejecuta la macro.

25 3.6.2. Se copia la tabla de resultados TaqMan® desde la hoja de macro en otra hoja, se introduce el número de serie del compuesto y el número de lote.

3.6.3. Desde esta hoja de Excel, se calcularán la media, desviación típica, y porcentaje CV de la actividad de inhibición del compuesto, así como la cantidad de copias de HCV, la cantidad Ct de HCV, y la cantidad Ct de BVDV (si estuviera disponible), de todos los puntos de dilución en 5 réplicas y el control sin compuesto.

30 3.6.4. Criterios para el rechazo de datos e implementación de TaqMan® de control de BVDV. Se comprueban todos los cálculos. Pueden rechazarse datos puntuales o series de placas completas. Si existe una desviación significativa del protocolo, fallo de reactivo o accidente, o fallo de ejecución de ABI 7700, pueden descartarse datos. Para el rechazo de cualquier dato puntual de una ejecución aparentemente normal, debe cumplirse uno o más de estos criterios. La desviación típica del porcentaje de inhibición debe ser menor del 30% en compuestos activos. El %CV del número de copias de HCV debe ser menor del 30%. La desviación típica de Ct de HCV de todas las muestras debe ser menor de 0,5; ésta es habitualmente de 0,1 a 0,3 en la mayoría de las muestras. Si la desviación típica de Ct de HCV es de más de 0,5, entonces se vuelve a la tabla de datos sin procesar, y se comprueban los números Ct de 5 réplicas. Si el número Ct de un pocillo cualquiera es 2 Ct diferente del número Ct promedio de 5 réplicas, entonces este pocillo se omitirá del análisis. Si más de 3 pocillos (no en la misma columna) tienen números Ct inusuales, entonces debe realizarse el ensayo de control interno TaqMan® de BVDV. Si los datos de BVDV muestran irregularidades, entonces debe ensayarse de nuevo el compuesto.

35 3.6.5. Cálculo de CI_{50} : Se copian y pegan los datos de la inhibición promedio y la desviación típica en una respuesta a dosis sigmoidea con un cálculo de pendiente variable que usa procedimientos de regresión no lineal. Usando esta herramienta, se calcula la CI_{50} usando los dos procedimientos: fijando el máximo al 100% de inhibición solamente, o fijando el máximo al 100% de inhibición y el mínimo al 0% de inhibición. El procedimiento que da el ajuste más claro se presenta entonces para cada compuesto. La CI_{50} más fiable proviene del cálculo que tiene el error típico más bajo. Si las CI_{50} calculadas a partir de estas dos opciones de ajuste de curva muestran una diferencia de factor mayor de uno, o si la DT de la CI_{50} es mayor de la CI_{50} , debe ensayarse de nuevo el compuesto a las concentraciones ajustadas.

40 45

50 Cálculo el efecto de los inhibidores de serina proteasa de HCV en combinación con interferones

El efecto de un inhibidor de serina proteasa de HCV (HSPI) y un interferón en combinación puede evaluarse en el ensayo de replicón generando una curva de respuesta a dosis para el HSPI en presencia de diversos niveles de interferón, o determinando una curva de respuesta a dosis para un interferón en presencia de diversos niveles de HSPI. El objetivo es evaluar si hay más o menos inhibición de acumulación de ARN viral que la que se esperaría si los dos fármacos produjeran efectos aditivos sobre el ARN. Más específicamente, se usa la definición de aditividad de Lowe ((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic, Ergebn. Physiol., 27, 47-187). Ésta se define del siguiente modo. Sea $D_{E,INF}$ la concentración del interferón que provoca el efecto E, y sea $D_{E,HSPT}$ la concentración de inhibidor de proteasa que provoca el efecto E.

55

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSPI}} \quad (1)$$

Entonces la ausencia de interacción o aditividad de Lowe se define por la siguiente relación, donde la combinación de concentración D_1 de INF y D_2 de HSPI produce el efecto E.

5 El grado de sinergia o antagonismo se expresa en términos de isocurvas de un efecto o Isoholes. La combinación (D_1, D_2) es un punto en un gráfico donde los ejes son las concentraciones de interferón y HSPI (Fig. 2). Todas estas combinaciones que producen un nivel de efecto E forma la Isobol del efecto E. Necesariamente ($D_{E,INF}, 0$) y ($0, D_{E,HSPI}$) son puntos en la Isobol. Las Isoholes son líneas rectas que conectan puntos ($D_{E,INF}, 0$) y ($0, D_{E,HSPI}$) cuando se satisface la relación de aditividad (1).

10 Isoholes cóncavas hacia arriba indican sinergia, e Isoholes cóncavas hacia abajo indican antagonismo. Siguiendo las directrices de Berenbaum, M. C. ((1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. J. Theor. Biol., 114, 413-431), y Greco, Park y Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327), se añade un término a (1) para explicar la sinergia o antagonismo. La ecuación define una superficie de respuesta que puede ajustarse a los valores porcentuales de control en todas las combinaciones de tratamiento. Las gráficas del contorno a partir de esta superficie de respuesta ajustada son las Isoholes.

El modelo de superficie de respuesta asume una respuesta a dosis sigmoidea para cada compuesto definido por (2).

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + \left(\frac{[Fármaco]}{CI_{50}}\right)^m} + B \quad (2)$$

Las concentraciones que dan un nivel especificado de actividad E solamente se dan por (3)

$$D_{E,INF} = CI_{50,INF} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/m_{INF}} \quad D_{E,HSPI} = CI_{50,HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/m_{HSPI}} \quad (3)$$

20 Para satisfacer el modelo de Greco y col. (1990), la acción combinada de los fármacos debe entonces satisfacer la ecuación (4) para cada combinación de fármacos que produce el nivel de respuesta E.

$$1 = \frac{[INF]}{CI_{50,INF} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/m_{INF}}} + \frac{[HSPI]}{CI_{50,HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/m_{HSPI}}} + \frac{\alpha [INF][HSPI]}{CI_{50,INF} CI_{50,HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/2m_{INF}} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B}\right)^{1/2m_{HSPI}}} \quad (4)$$

25 El parámetro α mide la cantidad de interacción. Un valor cero de alfa significa ausencia de interacción o aditividad ya que la ecuación se reduce a (1) cuando $\alpha = 0$. Dadas las CI_{50} , las pendientes (m), el valor máximo (E_{\max}), y el valor mínimo (B), esta ecuación puede resolverse para dar el efecto que resulta de cualquier combinación de tratamiento [INF] y [HSPI]. Por lo tanto, esta ecuación define una superficie de respuesta. Dado un experimento donde [INF] y [HSPI] se varían, los parámetros pueden elegirse usando regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados. El parámetro α puede relacionarse con una medida S de la sinergia (Hewlett, P. S. (1969) Measurement of potencies of drug mixtures. Biometrics, 25, 477-487), que se extrae directamente de las Isoholes a un 50% del efecto. S es la proporción de la distancia desde el origen hasta la Isobol que define la aditividad, a la distancia desde el origen hasta la Isobol de los datos ajustados, a lo largo de la línea a 45 grados desde los ejes. ($S = ON/OM$ véase la Figura 3). La relación es $\alpha = 4(S^2 - S)$.

30 El procedimiento analizado en Greco y col. (1990), anteriormente, para ajustar la superficie de respuesta y determinar el parámetro de sinergia α con su nivel de significancia se ha seguido en la evaluación del grado de

sinergia en una serie de experimentos que ensayan HSPI en combinación con varios interferones diferentes. Sin embargo, existe la necesidad de ponderar las observaciones con recuentos inferiores más que aquellas con recuentos superiores. Los recuentos se relacionan directamente con el control del porcentaje, que es el efecto E. Usando los procedimientos descritos en Carroll, R.J. y Rupert, D. ((1988) (Transformation and Weighting in Regression, Chapman y Hall, Nueva York), puede observarse que la variabilidad entre pocillos aumenta con el cuadrado de la media del valor del control del porcentaje. Por lo tanto, las observaciones se ponderan sobre el valor del control del porcentaje ajustado (E) al cuadrado. La varianza y ponderación usadas para analizar estos experimentos es coherente con las relaciones de variabilidad observadas por los investigadores que investigan procedimientos para analizar ensayos con Radioligando (Finney, D. J., (1976), Radioligand Assay, Biometrics, 32, 721-740, y Dudley, R. A. Edwards, P., Ekins, R.P., McKinzie, I. G. M., Raab, G.M., Rodbard, D. y Rodgers, R.P.C. (1985), Guidelines for Immunoassay Data Processing, Clinical. Chemistry, 31/8, 1264-1271).

Resultados

En un experimento inicial, se ensaya el Compuesto de Comparación CU inhibidor de la serina proteasa de HCV sobre un intervalo de concentración de 3 µM a 0,0123 µM, es decir, un intervalo de factor 244. Las concentraciones de interferon alfa 2B varían de 30 unidades por muestra a 0,0096 unidades por muestra, es decir, un intervalo de factor 3125. Como se muestra en la Tabla 7, cuando se usa como único tratamiento de fármaco, el Compuesto de Comparación CU muestra una CI₅₀ de 0,48 µM, y la CI₅₀ del interferón es 2,19 U. Dentro de la precisión del ensayo de replicación, que es de aproximadamente el 20%, la adición de interferón alfa 2B provoca un aumento en la inhibición de la acumulación de ARN de replicación de un modo dependiente de la dosis. Por ejemplo, el tratamiento de las células con Compuesto de Comparación CU 0,333 µM provoca una inhibición del 28% de la acumulación del ARN de replicación. El tratamiento de las células con una combinación de Compuesto de Comparación CU 0,333 µM, que es el 71% de la dosis CI₅₀ (0,469 µM) y 0,24 U de interferón alfa 2B, que es el 11% de la CI₅₀ de interferón alfa 2B (2,05 µM) provoca una inhibición del 49% de la acumulación del ARN de replicación. Por tanto, el 71% de una dosis CI₅₀ en combinación con el 11% de la otra provoca una inhibición del 49% de la acumulación del ARN de replicación. Usando un enfoque intuitivo para determinar si un tratamiento de combinación es sinérgico o aditivo o antagonista, podría predecirse que si el efecto del tratamiento de combinación fuera solamente aditivo, se esperaría que las fracciones combinadas de las dos dosis CI₅₀ necesarias para obtener una inhibición del 49% de la acumulación del ARN de replicación fueran del 98%. Nuestros resultados experimentales demuestran que el nivel de inhibición de la acumulación de ARN de replicación se consigue usando el 71% más el 11%, es decir el 82% de la dosis CI₅₀ en lugar del 98%, como se predice para efectos aditivo de tratamiento de combinación. Por tanto, para estas concentraciones de compuestos, el efecto parece ser sinérgico a causa de las dosis fraccionadas más pequeñas de la dosis CI₅₀ de cada compuesto usadas para obtener el 49% de la inhibición del ARN de replicación de HCV que las que se necesitarían de cualquier compuesto solo, donde se necesitarían el 98% de las dosis CI₅₀. Los resultados de este tratamiento de combinación se muestran en la Tabla 8 y de forma gráfica en la Figura 1.

TABLA 7

Inhibición de la acumulación de ARN de replicación después de 48 horas de tratamiento con compuesto de comparación CU e interferón-alfa 2B, individualmente o en combinación con interferón-alfa 2B (unidades)							
Compuesto CU (conc.)	30 U	6 U	1,2 U	0,24 U	0,048 U	0,0096 U	0 U
3 µM	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 µM	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0,333 µM	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0,1111 µM	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,0370 µM	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,0123 µM	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 µM	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

Estos resultados iniciales, obtenidos como se ha indicado anteriormente mediante el uso del ensayo de replicación in vitro y un análisis de aditividad simple de los datos generados por ese ensayo, demuestran que el tratamiento de combinación de las células de replicación con un inhibidor de serina proteasa de HCV y un interferón produce al menos un efecto antiviral aditivo, y probablemente un efecto antiviral sinérgico.

Los datos anteriores se han vuelto a analizar usando las herramientas matemáticas formales descritas anteriormente para determinar si la relación entre el inhibidor de comparación CU de la serina proteasa de HCV y el interferón alfa 2B es sinérgica, aditiva o antagonista. Los datos reanalizados se muestran de forma numérica en la Tabla 8, y de forma gráfica en la Figura 4.

La Tabla 8 resume los resultados adicionales obtenidos en el ensayo de replicación después del tratamiento de las células que contienen replicación durante 48 horas con diversos inhibidores de serina proteasa de HCV de la presente

5 invención y varios interferones diferentes, de forma individual o en combinación. Hay que indicar que la desviación típica de los valores medidos para la inhibición del ARN de replicación de HCV en el ensayo de replicación es de ~20%. Los compuestos se ensayan sobre un amplio intervalo de concentración y a concentraciones inferiores de compuesto que no causan inhibición significativa de la concentración del ARN de replicación de HCV. A causa de la desviación típica de ~20% del ensayo, algunos datos puntuales generaran números negativos. Los números negativos de inhibición indican en un experimento particular que hay de promedio más moléculas de ARN de replicación de HCV en las muestras tratadas con compuesto que en las muestras con tratamiento simulado.

TABLA 8

INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ARN DE REPLICACIÓN DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE SERINA PROTEASA DE HCV Y DIFERENTES INTERFERONES, INDIVIDUALMENTE O EN COMBINACIÓN

EXPERIMENTO 1

		IFN alfa-2B (unidades)						
		30,00	6,00	1,20	0,24	0,048	0,0096	0,000
Compuesto de comparación CU (µM)	0,000	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%
	0,012	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
	0,037	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
	0,111	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
	0,333	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
	1,000	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
	3,000	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%

10

EXPERIMENTO 2

		IFN alfa-2A (unidades)						
		30	6	1,2	0,24	0,048	0,0096	0
Compuesto de comparación CU (µM)	0	86%	61%	27%	4%	-7%	5%	0%
	0,0123	87%	66%	17%	-23%	8%	8%	10%
	0,37	85%	62%	13%	-2%	0%	-1%	1%
	0,1111	87%	68%	37%	20%	-6%	12%	10%
	0,333	92%	77%	58%	41%	26%	25%	44%
	1	98%	96%	90%	86%	84%	83%	85%
	3	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%

EXPERIMENTO 3

		Compuesto de comparación CU (µM)								
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
Interferón alfa-2B (unidades)	0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	-2%	0
	0,049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%	3%
	0,123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%	2%
	0,307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	19%	-3%
	0,768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%	28%
	1,920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%	45%
	4,8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%	59%
	12,0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	85%	80%
	30,0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	92%	93%	89%

(continuación)

EXPERIMENTO 4

		Compuesto de comparación CU (μM)								
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
Interferón alfa-2A (unidades)	0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%	0%
	0,049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%	6%
	0,123	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%	-8%
	0,307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%	10%
	0,768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%	15%
	1,920	98%	96%	73%	48%	43%	44%	27%	33%	29%
	4,8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%	43%
	12,0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%	73%
	30,0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	84%	83%

EXPERIMENTO 5

		Compuesto de comparación CU (μM)								
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
Interferón tau ovino (unidades)	0,0	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0
	0,9375	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%
	1,875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
	3,75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
	7,5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
	15	98%	97%	84%	64%	59%	61%	56%	51%	53%
	30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%
	60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%
	120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%

5

EXPERIMENTO 6

		Compuesto de comparación EC (μM)								
		3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
Interferón- alfa 2B (unidades)	0	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0
	0,0492	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%
	0,1229	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
	0,3072	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%
	0,768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
	1,92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	54%	58%	47%
	4,8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
	12,0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
	30,0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%

(continuación)

EXPERIMENTO 7

		Compuesto de comparación EC (µM)								
		3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
Interferón- alfa-2A (unidades)	0	96%	92%	81%	47%	28%	17%	-1%	-8%	0
	0,0492	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	10%	-17%
	0,1229	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	-22%
	0,3072	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
	0,768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
	1,92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%
	4,8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
	12,0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
	30,0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%

EXPERIMENTO 8

		Compuesto de comparación CU (µM)								
		3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
Interferón- beta (unidades)	0	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
	0,2344	98%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	-7%	1%
	0,4688	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
	0,9375	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%	30%
	1,875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
	3,75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
	7,5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
	15,0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
	30,0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%

5

EXPERIMENTO 9

		Compuesto de comparación EP (µM)								
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0
Interferón- alfa-2B (unidades)	0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
	0,0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	8%	3%
	0,1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
	0,3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
	0,7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
	1,92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
	4,8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%
	12	97%	98%	98%	97%	94%	89%	89%	87%	83%
	30	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%

(continuación)

EXPERIMENTO 10										
		Ribavirina (μM)								
		200	80	32	12,8	5,12	2,048	0,8192	0,3277	0
	0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
Interferón- alfa-2B (unidades)	0,0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
	0,1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
	0,3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
	0,7680	90%	80%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
	1,92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	46%
	4,8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
	12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
	30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

Como se muestra en las Figuras 4-13, que representan de forma gráfica los datos de la Tabla 8 representados usando el procedimiento matemático descrito anteriormente para medir la sinergia, las curvas Isobol para todas las combinaciones de inhibidores de serina proteasa de HCV e interferones ensayados son cóncavas hacia arriba, lo que indica que el efecto antiviral de los tratamientos en el ensayo de replicón es sinérgico. Estos resultados se tabulan en la Tabla 9, que muestra los niveles relativos de sinergia para el tratamiento de combinación y los valores de CI_{50} para los compuestos antivirales usados de forma individual. Los elementos clave en la Tabla 9 son los valores α , y los valores-p para las determinaciones. El término α es una medida de la inflexión máxima de las Isobol para cada tratamiento de combinación. Un valor α de cero indica aditividad, un valor negativo indica antagonismo, y como es el caso en los tratamientos de combinación con los inhibidores de serina proteasa de HCV e interferones mostrados anteriormente, un valor mayor de uno indica sinergia. Cuanto mayor es el parámetro α , mayor es la sinergia. Como se muestra en la Tabla 9 para las combinaciones de inhibidores de serina proteasa de HCV e interferones, incluso ignorando los niveles de significancia en cada experimento, un ensayo t basado en los 9 experimentos para el valor alfa promedio siendo 0 (sin interacción) tiene un valor-p de 0,00014, lo que indica que los resultados son altamente significativos.

El cálculo de la sinergia basado en el procedimiento de Greco Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Dmg Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D-Arabinofuranosyl cytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327) usado en este análisis es una herramienta ideal para la evaluación del tipo de datos experimentales que pueden generarse usando el ensayo de replicón de HCV. Existen otros procedimientos que se aplican a estudios de compuestos antivirales tales como Pritchard y Shipman (Pritchard, M.N., y Shipman, C. Jr., (1990) "A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions (revisión)," Antiviral Res. 14:181-206). La aplicación de su procedimiento de cálculo de sinergia a los datos mostrados en la Tabla 8 también indica que el tratamiento de combinación de las células de replicón con un inhibidor de serina proteasa de HCV e interferón provocará una inhibición sinérgica de la acumulación de ARN de replicón de HCV (datos no mostrados).

TABLA 9

NIVELES RELATIVOS DE SINERGIA PARA TRATAMIENTO DE COMBINACIÓN Y VALORES DE CI_{50} PARA LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES USADOS INDIVIDUALMENTE						
	COMPARACIÓN Inhibidor de serina proteasa de HCV (HSPI)	Interferón	CI_{50} INF (unidades)	CI_{50} HSPI (μM)	α (ET) ¹	vapor P $\alpha > 0$
Experimento 1	Compuesto CU	IFN alfa-2B	2,05	0,469	0,477 (0,09)	<0,0001
Experimento 2	Compuesto CU	IFN alfa-2A	3,72	0,446	0,770 (0,12)	<0,0001
Experimento 3	Compuesto CU	IFN alfa-2B	2,36	0,587	0,730 (0,08)	<0,0001
Experimento 4	Compuesto CU	IFN alfa-2A	5,67	0,633	0,438 (0,08)	<0,0001
Experimento 5	Compuesto CU	IFN tau	13,22	0,605	0,328 (0,07)	<0,0001
Experimento 6	Compuesto EC	IFN alfa-2B	2,53	0,384	0,516 (0,10)	<0,0001
Experimento 7	Compuesto EC	IFN alfa-2A	5,50	0,312	1,24 (0,20)	<0,0001
Experimento 8	Compuesto CU	IFN beta	1,82	0,466	0,551 (0,09)	<0,0001
Experimento 9	Compuesto EP	IFN alfa-2B	3,06	0,426	0,490 (0,12)	<0,0001
Experimento 10	Ribavirina	IFN alfa-2B	1,22	145	-0,24 (0,067)	0,0004

¹(ET) Error típico

Otra medida para evaluar la naturaleza sinérgica del tratamiento con fármaco anti-HCV usando los presentes inhibidores de serina proteasa de HCV e interferones es usar los mismos procedimientos descritos anteriormente para evaluar la actual terapia convencional de combinación para HCV, es decir, interferón alfa 2B en combinación con Ribavirina en el ensayo de replicón. La última línea de la Tabla 9 muestra que el parámetro α para una mezcla de interferón alfa 2B y Ribavirina es un número negativo, lo que indica que existe una pequeña cantidad de antagonismo entre estos dos fármacos. Esto pone de relieve adicionalmente la significancia de los tratamientos de combinación desvelados en el presente documento empleando los presentes inhibidores de serina proteasa de HCV en combinación con interferones porque estos tratamientos producen claramente sinergia, mientras que la terapia convencional de combinación en uso para HCV (interferón alfa 2B en combinación con Ribavirina) no es sinérgica en el ensayo de replicón.

La comparación anterior de los tratamientos de combinación empleando los presentes inhibidores de serina proteasa de HCV más interferones frente a Ribavirina más interferón en el ensayo de replicón indica claramente que los primeros son sinérgicos, mientras que los últimos no. Los resultados experimentales obtenidos usando el ensayo de replicón indican que una dosis muy inferior interferón sería eficaz si el interferón se usa en combinación con un inhibidor de serina proteasa de HCV que la necesaria cuando se usa interferón alfa 2B en combinación con Ribavirina. El ensayo de replicón es un sistema modelo útil en el cual ensayar compuestos anti-HCV potenciales, y actualmente es utilizado mayoritariamente como un predictor eficaz de actividad anti-HCV del compuesto. Consúltese, por ejemplo, Blight y col. (2000) Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* 8; 290:1972-1974, y Chung y col. (2001) Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98(17):9847-52. La Ribavirina sola es marginalmente eficaz en la reducción de la acumulación de ARN de replicón de HCV en el ensayo de replicón (Tabla 8, Experimento 10 y última línea de la Tabla 9). Este resultado está en aparente conflicto con los estudios *in vivo* donde, cuando se usa por sí misma, la Ribavirina no tiene valor terapéutico significativo para el tratamiento de HCV. En contraste, en el ensayo de replicón, corrigiendo la citotoxicidad como se analiza a continuación, la Ribavirina tiene Cl_{50} de 145 μ M. Este resultado puede explicarse reconociendo que el ensayo de replicón permite la evaluación de altas concentraciones de Ribavirina que no serían posibles en terapia humana debido a la citotoxicidad *in vivo* (Chutaputti A. (2000) Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15 Supl: E156-63).

Esta evaluación requiere necesariamente ensayar la citotoxicidad de Ribavirina. Dicha toxicidad sucede en pacientes y en ensayos celulares (Shiffman M. L., Verbeke S. B., Kimball P. M. (2000) Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes. *Antiviral Research*. 48(2):91-9). En los experimentos analizados en el presente documento, la citotoxicidad por Ribavirina en el ensayo de replicón se observa y mide de dos modos. Tanto en el ensayo metabólico XTT para determinar la viabilidad de células de replicón (Roehm N.W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunol. Methods*. 142(2):257-65) como en el ensayo de RT-PCR cuantitativa TaqMan® que mide los niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en células tratadas frente a no tratadas en el ensayo de replicón (Brink N., Szamel M., Young A.R., Wittern K.P., Bergemann J. (2000) Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. *Inflammation Research*. 49(6):290-6), se observa citotoxicidad significativa inducida por Ribavirina, pero se corrige del siguiente modo. Se supone que el nivel de ARNm de GAPDH, que es un gen constitutivo expresado de forma constitutiva, es el mismo en todas las células viables. Se sabe a partir de las mediciones de los niveles de ARNm de GAPDH en células tratadas con el inhibidor de la transcripción actinomicina D que la semivida del ARNm de GAPDH es de solamente unas pocas horas (datos no mostrados). Por tanto, se postula, como hacen otros usando la tecnología TaqMan® para determinar los niveles de ARNm particulares en células humanas, que los niveles de ARNm de GAPDH son proporcionales a las cantidades de células viables (VCN) en cualquier muestra dada, con la relación de $VCN=2^{(40-Ct_{ARNm_{GAPDH}})}$. Las VCN se computan para cada uno de los pocillos de muestra del ensayo de replicón, y después se dividen por el número de copias de ARN de replicón de HCV para un pocillo específico por la VCN para ese pocillo. Una vez computada, esta proporción se usa en lugar del número de copias de HCV para computar la inhibición ("inhibición promedio usando la proporción"; Fig 14A). Sin corregir los datos del ensayo de replicón para esta citotoxicidad, dicha citotoxicidad se lee como una inhibición positiva falsa de la acumulación de replicón de ARN de HCV. En el ensayo de replicón, se asume que la inhibición medida de la acumulación de replicón de ARN de HCV es la suma de la inhibición real de la acumulación de replicón de ARN de HCV y la inhibición aparente de la acumulación de replicón de ARN de HCV debida a la citotoxicidad. Además se asume que, en base a la estrecha correlación de las medidas por ARNm de GAPDH por XTT y TaqMan® de la citotoxicidad, la inhibición de la acumulación de ARNm de GAPDH causada por los compuestos ensayados en el ensayo de replicón es una medida fiable de la inhibición aparente de la acumulación de replicón de ARN de HCV debida a citotoxicidad. Por tanto, la verdadera actividad anti-HCV de un compuesto en el ensayo de replicón corregido para la citotoxicidad general puede estimarse dividiendo la cantidad de moléculas de ARN de replicón de HCV medida en cada muestra por la VCN, normalizando de este modo a la cantidad de células viables en cada muestra. Usando este procedimiento, la Fig. 4A muestra una estimación de la verdadera actividad anti-HCV de Ribavirina en el ensayo de replicón ("inhibición promedio usando la proporción"). La estimación de la Cl_{50} para Ribavirina se calcula mejor usando este procedimiento. La Fig. 4A, "inhibición promedio original" muestra la Cl_{50} no corregida para Ribavirina, que es de aproximadamente 80 μ M, mientras que el valor de Cl_{50} corregido calculado a partir de la curva de

"inhibición promedio usando la proporción" es de aproximadamente 145 μM . Obsérvese que la diferencia entre la inhibición corregida y medida de la acumulación de replicón de ARN de HCV como resultado del tratamiento con interferón alfa-2B (Fig. 14.B) es insignificante en vista del porcentaje CV de ~20% del ensayo de replicón. Como el interferón alfa-2B, los inhibidores de serina proteasa de HCV ensayados en el presente ejemplo no muestran citotoxicidad significativa a las concentraciones empleadas. Esto se determina usando ensayos XTT, en que los valores de CT_{50} para los diversos compuestos son: CU=64,7 μM , EP>10 μM , y EC>50 μM . Estos valores de CT_{50} son 20-140 veces mayores que los valores de CI_{50} mostrados en la Tabla 9. Por tanto, la citotoxicidad de estos compuestos no tiene efecto significativo sobre la acumulación de ARN de HCV en el ensayo de replicón dentro de la precisión del ensayo porque dicha citotoxicidad sucede solamente a concentraciones de inhibidor de serina proteasa de HCV significativamente mayores que las ensayadas en el ensayo de replicón.

Conclusiones respecto a la eficacia de los inhibidores de la serina proteasa de HCV e interferones, individualmente y en combinación

Las actividades anti-HCV de los presentes inhibidores de la serina proteasa de HCV y diversos interferones cuando se usan solos en el ensayo de replicón de HCV se muestran en las columnas y líneas de los experimentos individuales que componen la Tabla 8 que emplea solamente un agente antiviral. La Tabla 9 enumera los valores de CI_{50} medidos para compuesto antiviral cuando se ensayan solos. Los resultados anteriores, obtenidos mediante el uso del ensayo de replicón *in vitro*, también demuestran que el tratamiento de combinación de las células de replicón con inhibidores de la serina proteasa de HCV de la presente invención y diversos interferones produce efectos antivirales sinérgicos. Se prevé que estos efectos se traduzcan en eficacia *in vivo*.

La terapia de combinación empleando inhibidores de serina proteasa de HCV de la presente invención posee varias ventajas principales sobre la terapia de fármacos individuales. En primer lugar, haciendo posible el tratamiento con dosis inferiores de los fármacos individuales a las que serían posibles si se usaran solos, se esperaría una reducción en la toxicidad y los efectos secundarios asociados con el tratamiento. Esto es especialmente importante en el caso de terapia con interferón, donde los efectos secundarios son severos, y se ha demostrado que son proporcionales a la dosis administrada a los pacientes. Los datos anteriores indican que una dosis de inhibidor de serina proteasa de HCV tal como el compuesto de comparación CU al nivel CI_{95} podría combinarse con una dosis de interferón alfa, por ejemplo, al nivel de CI_{50} , y el resultado sería una terapia mucho más eficaz que la que podría conseguirse con el inhibidor de la serina proteasa de HCV en solitario sin los efectos adversos causados por elevadas dosis de interferón alfa. Un segundo beneficio principal de la terapia de combinación es que como los dos fármacos actúan independientemente, existe menos oportunidad de desarrollo de cepas HCV mutantes que resistan al tratamiento. El desarrollo de resistencia es una preocupación principal con virus ARN como HCV. A causa de su elevada tasa de mutación, dichos virus pueden adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales. Un tercer beneficio de la terapia de combinación puede ser el coste reducido, debido a la necesidad de cantidades inferiores de agentes terapéuticos necesarias para un tratamiento eficaz.

Los inmunomoduladores adicionales que pueden emplearse en los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen, por ejemplo, interferón alfa 2A, interferón consenso, interferón tau, interferón + Ribavirina (Rebatron), interferón pegilado, y promotores de la expresión génica de interferón. Se prevé que la actividad anti-HCV de estos compuestos se mejorara cuando se usen en combinación con inhibidores de la serina proteasa de HCV tales como los desvelados en el presente documento. Como se sabe que los interferones activos *in vivo* y en el ensayo de replicón, se espera que los presente inhibidores de la serina proteasa de HCV también sean activos *in vivo*, y de forma más importante, sean capaces de provocar actividad sinérgica cuando se usen en combinación con interferones, estimuladores del sistema inmune de los mismos, u otros compuestos que tengan actividad antiviral de HCV que actúen mediante un mecanismo diferente a la inhibición de la serina proteasa de HCV.

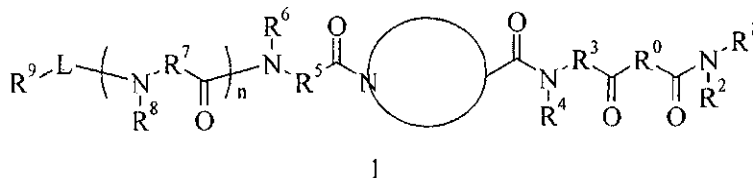
La mejor terapia actual para HCV emplea interferón alfa y el análogo nucleosídico Ribavirina. Este tratamiento es solamente eficaz de forma marginal, y provoca significativos efectos secundarios que disminuyen el cumplimiento por parte del paciente (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Adicionalmente, en pacientes de trasplante, no está claro que la combinación Ribavirina-interferón funcione, y de hecho puede ser peor que el interferón solo (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999).

Los resultados presentados anteriormente demuestran un efecto sinérgico de combinación cuando se usan interferones con una nueva clase de antivirales para HCV, los inhibidores de serina proteasa de la presente invención. Esperamos que los resultados *in vitro* desvelados en el presente documento conduzcan a un tratamiento más eficaz de pacientes de HCV que lo actualmente posible usando interferón solo. Dosis subterapéuticas de interferón podrían movilizar el sistema inmune del paciente para combatir mejor al virus, y el inhibidor de serina proteasa podría atacar al virus directamente, afrontando el virus un ataque de dos frentes mediante diferentes mecanismos de acción. El tratamiento de la infección por HCV por tanto podría conseguirse a un coste reducido para el paciente en términos tanto de efectos secundarios disminuidos como de pagos inferiores por agentes farmacéuticos necesarios ya se necesitarían menos de ambos fármacos para una terapia eficaz antiviral de HCV.

La presente invención puede plasmarse en otras formas específicas sin alejarse del espíritu o atributos esenciales de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de tal compuesto, o su sal, en la que:

- 5 R^0 es un enlace o difluorometileno;
 R^1 es hidrógeno, grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
 R^2 y R^9 son cada uno independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico
 10 opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
 R^3 y R^5 son cada uno independientemente un metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido y
 R^7 es metileno de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido, metileno de grupo cíclico inferior
 opcionalmente sustituido
 o (aril o heteroaril) metileno monocíclico opcionalmente sustituido;
 cada uno de R^4 , R^6 , R^8 y R^{10} es independientemente hidrógeno o grupo alifático opcionalmente sustituido;

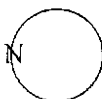


- 15 es un azaheterociclilo monocíclico sustituido, en el que
 el grupo azaheterociclilo monocíclico está sustituido a través de un grupo de unión por al menos un
 sustituyente seleccionado entre arilo, heteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, aroilo o su análogo tioxo,
 heteroaróilo o su análogo tioxo, aroiloxi, heteroaróiloxi, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, arilsulfonilo,
 20 heteroarilsulfonilo, arilsulfinilo, heteroarilsulfinilo, ariltio, heteroariltio, arildiazo, heteroarildiazo, Y^1Y^2N- ,
 $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$ en los que Y^1 , Y^2 e Y^3 son independientemente
 hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y^3 es alquilo, cicloalquilo arilo o heteroarilo, o cuando el
 sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, ciclicarbonilo, aroilo, heteroaróilo,
 25 alcóxicarbonilo, ciclicloxycarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se aquí y el otro de Y^1 e
 Y^2 es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$,
 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1
 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros; y al menos uno
 de Y^1 e Y^2 es arilo o heteroarilo, en el que dicho grupo de unión es $-C(O)-$ o $-OC(O)-$,
 en el que:

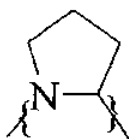
- 30 (i) sustituyentes de grupo alifático significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi,
 heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, ciclicarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo,
 heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclicarboniloxi, aroiloxi, heteroaróiloxi, halo, nitro, ciano,
 carboxi (ácido), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, sulfo, fosfona,
 35 alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo,
 heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o
 hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, alcóxicarbonilo,
 ciclicloxycarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, ciclicilsulfonilo, arilsulfonilo,
 heteroarilsulfonilo, alquilsulfinilo, ciclicilsulfinilo, arilsulfinilo, heteroarilsulfinilo, alquiltio, cicliciltio,
 40 ariltio, heteroariltio, ciclicilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, metileno ($H_2C=$), oxo ($O=$), tioxo ($S=$), Y^1Y^2N- ,
 $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1Y^2NSO_2-$, o $Y^3SO_2NY^1-$ en el que R^2 es tal como se
 define aquí, Y^1 e Y^2 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y^3 es alquilo,
 cicloalquilo arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede
 ser acilo, ciclicarbonilo, aroilo, heteroaróilo, alcóxicarbonilo, ciclicloxycarbonilo, ariloxicarbonilo o
 heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido
 45 previamente, o cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o
 $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2
 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros;
 (ii) sustituyentes de grupo de anillo significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi,
 heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, ciclicarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo,
 50 heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclicarboniloxi, aroiloxi, heteroaróiloxi, halo, nitro, ciano,

- 5 carboxi (ácido), bioisótero de ácido, alcoxycarbonilo, ciclioxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxycarbonilo, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, cicliisulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, cicliitio, ariltio, heteroariltio, ciclilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, en los que Y^1 , Y^2 e Y^3 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, cicliicarbonilo, aroilo, heteroarilo, alcoxycarbonilo, ciclioxycarbonilo, ariloxycarbonilo o heteroariloxycarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros, o cuando un sistema de anillo está saturado o parcialmente saturado, los "sustituyentes de grupo de anillo" incluyen además, metileno ($H_2C=$), oxo ($O=$) y tioxo ($S=$);
- 10 (iii) arilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono;
- 15 (iv) cicloalquilo significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono;
- (v) cicloalqueno significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono;
- 20 (vi) ciclilo significa cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo o heterociclenilo;
- (vii) heterociclilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico saturado no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono;
- 25 (viii) heterociclenilo significa un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico o multicíclico no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno; y
- (ix) heteroarilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono;

L es $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR^{10}C(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-NR^{10}S(O)_2-$; y n es 0 o 1; con la condición de que cuando



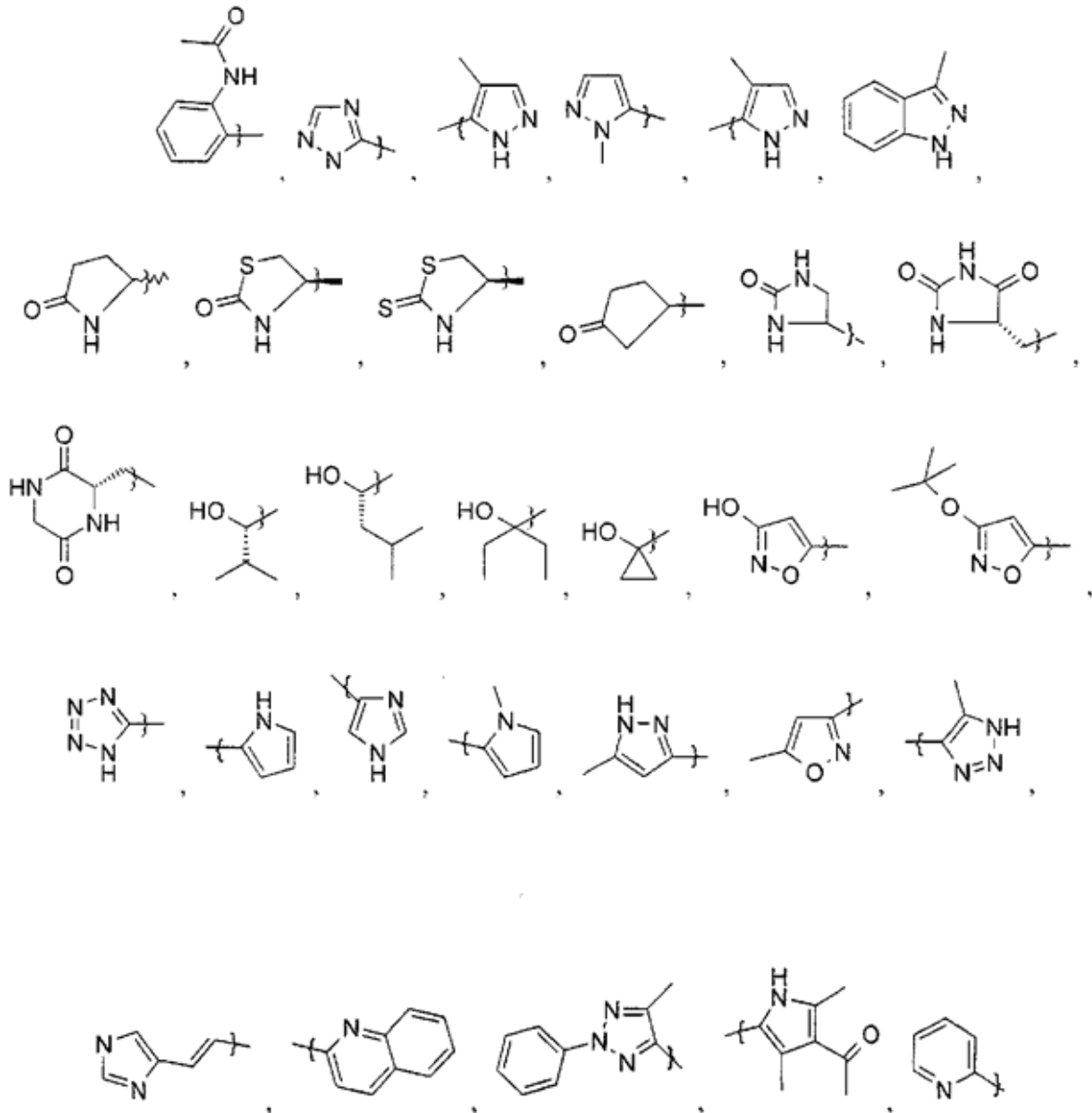
Esta sustituido



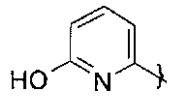
- 40 entonces L es $-OC(O)-$ y R^9 es un grupo alifático opcionalmente sustituido; o al menos uno de R^3 , R^5 y R^7 es etileno, sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido y en el que el etileno está además opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo alifático; o R^4 es un grupo alifático opcionalmente sustituido;
- 45 cíclico es un sistema de anillo mono- o multicíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono; un sistema de anillo mono- o multicíclico no aromático de 3 a 10 átomos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono; un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado no aromático de 3 a 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo; o un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado no aromático de 3 a 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono;
- 50 aromático es un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 10 átomos de carbono, o un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 5 a 14 en el que uno o más de los átomos en el anillo es un heteroátomo; grupos alifáticos opcionalmente sustituidos son alquilo, alqueno o alquino, opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo alifático; grupos cíclicos opcionalmente sustituidos son grupos cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo o

- heterociclenilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;
 grupos aromáticos opcionalmente sustituidos son grupos arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;
- 5 grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;
 grupos (1,1- o 1,2) heterociclenilo opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) heterociclenilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo.
2. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que R^0 es un enlace.
3. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que R^0 es difluorometileno.
- 10 4. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que R^1 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
5. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que R^1 es hidrógeno o alquilo inferior.
6. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que R^1 es hidrógeno.
- 15 7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que R^2 es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o grupo monocíclico opcionalmente sustituido.
8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que R^2 es alquilo inferior opcionalmente sustituido, alqueno inferior opcionalmente sustituido, o cicloalquilo monocíclico opcionalmente sustituido.
9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que R^2 es carboximetilo, 1-carboxi-2-feniletilo, ciclopropilo, ciclobutilo, 1-ciclohexitetilo, 1-feniletilo, but-2-ilo, 1-pirid-4-iletilo, propen-3-ilo o 3-metilbut-2-ilo.
- 20 10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que R^3 es metileno (de alquilo o alqueno inferior) opcionalmente halosustituido.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que R^3 es propilmetileno, 2,2-difluoroetilmetileno, 2,2,2-trifluorometileno o propen-3-ilmetileno;
12. Un compuesto de la reivindicación 11 en el que R^3 es propilmetileno o 2,2-difluoroetilmetileno.
- 25 13. Un compuesto de la reivindicación 12 en el que R^3 es propilmetileno.
14. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que R^4 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
15. Un compuesto de la reivindicación 14 en el que R^4 es hidrógeno.
- 30 16. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que R^5 es metileno (de alquilo o alqueno inferior) opcionalmente (fenil-, carboxi-, carboxamido- o alcoxicarbonil) sustituido.
17. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en el que R^5 es metilmetileno, isopropilmetileno, t-butilmetileno, but-2-ilmetileno, butilmetileno, bencilmetileno, 3-metilbutilmetileno, 2-metilpropilmetileno, carboximetilmetileno, carboxamidometilmetileno, benciloxicarbonilmetilmetileno, benciloxicarbonilpropilmetileno o fenilpropen-3-ilmetileno.
- 35 18. Un compuesto de la reivindicación 17 en el que R^5 es isopropilmetileno o t-butilmetileno.
19. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en el que R^6 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
20. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en el que R^6 es hidrógeno o alquilo inferior.
21. Un compuesto de la reivindicación 20 en el que R^6 es hidrógeno.
- 40 22. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 en el que R^7 es alquilmetileno inferior opcionalmente sustituido, cicloalquilmetileno inferior opcionalmente sustituido o fenilmetileno opcionalmente sustituido.
23. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en el que R^7 es metilmetileno, isopropilmetileno, n-propilmetileno, fenilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, t-butilmetileno, s-butilmetileno, ciclohexilmetilmetileno, o fenilmetilmetileno.
- 45 24. Un compuesto de la reivindicación 23 en el que R^7 es isopropilmetileno, ciclohexilmetileno, ciclopentilmetileno, t-butilmetileno o s-butilmetileno.

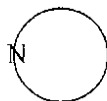
25. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en el que cada uno de R^3 , R^5 , y R^7 es metileno monosustituido.
26. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 en el que R^3 es metileno monosustituido y tiene una configuración (S) en el carbono unido al resto $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$.
- 5 27. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en el que R^8 es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
28. Un compuesto de la reivindicación 27 en el que R^8 es hidrógeno o alquilo inferior.
29. Un compuesto de la reivindicación 28 en el que R^8 es hidrógeno.
- 10 30. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es un grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o grupo aromático monocíclico opcionalmente sustituido.
31. Un compuesto de la reivindicación 30 en el que R^9 es alquilo inferior opcionalmente sustituido o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.
- 15 32. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 en el que R^9 es alquilo inferior opcionalmente (carboxi-, (alquilo inferior)SO₂NH-, (alquilo inferior)HNCO-, hidroxi-, fenil-, heteroaril-, o (alquilo inferior)OC(O)NH-) sustituido, o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.
33. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es alquilo inferior sustituido con (mono- o di-) MeOC(O)NH-.
34. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es alquilo inferior (carboxi-, (alquilo inferior)HNCO- o tetrazolil) sustituido.
- 20 35. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo, 3-(N-metilcarboxamido)propilo o 3-carboxi-2,2-dimetilpropilo.
36. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es 3-carboxipropilo, 2-tetrazol-5-ilpropilo o 3-(N-metilcarboxamido)propilo.
- 25 37. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es alquilo inferior opcionalmente sustituido.
38. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es 1-hidroxi-2-feniletilo, isopropilo o t-butilo.
39. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 es isopropilo o t-butilo.
- 30 40. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R^9 se selecciona entre el grupo que consiste en



y

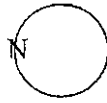


41. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en el que R⁹ es pirazinilo.
- 5 42. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 en el que R¹⁰ es hidrógeno o grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
43. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 en el que R¹⁰ es hidrógeno o alquilo inferior.
44. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 en el que R¹⁰ es hidrógeno.
45. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44 en el que

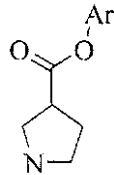


como un azaheterocicilo monocíclico sustituido es pirrolidinilo sustituido.

46. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44 en el que



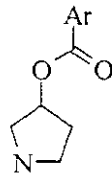
como un azaheterocicilo monocíclico sustituido es



5

opcionalmente sustituido

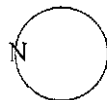
o



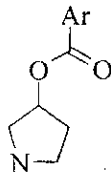
opcionalmente sustituido,

10 en el que Ar es R² que comprende un resto aromático.

47. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44 en el que

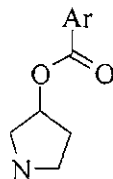


como un azaheterocicilo monocíclico sustituido es

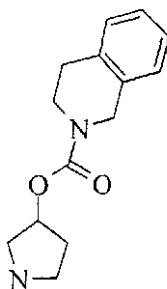


15 opcionalmente sustituido.

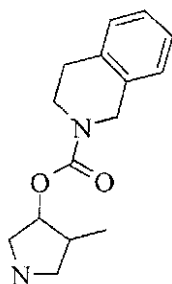
48. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44 en el que



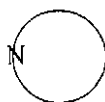
es



o

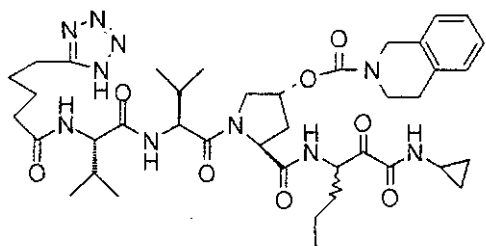


- 5 49. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48 en el que el resto $-C(O)-N(R^4)-R^3-$
 $C(O)R^0C(O)NR^2R^1$ unido a

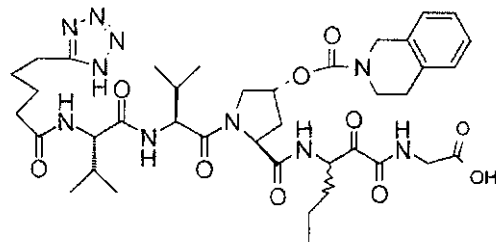


está unido a un carbono α con respecto al átomo de nitrógeno.

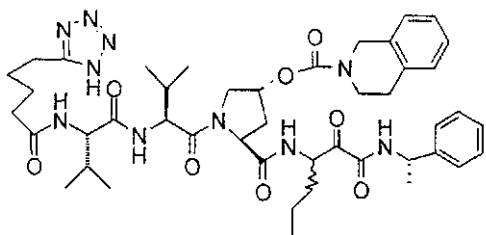
50. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49 en el que L es $-C(O)-$ o $-OC(O)-$.
51. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50 en el que n es 0.
- 10 52. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50 en el que n es 1.
53. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:



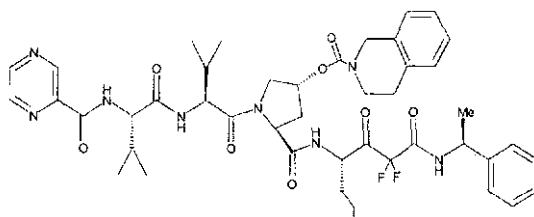
AK,



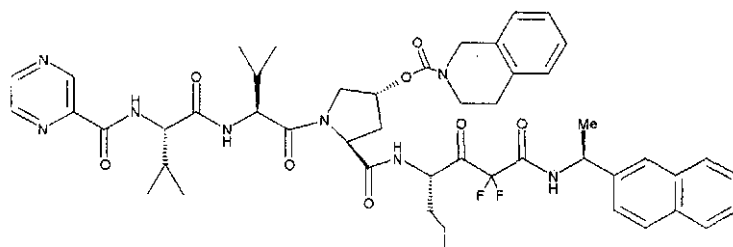
AL,



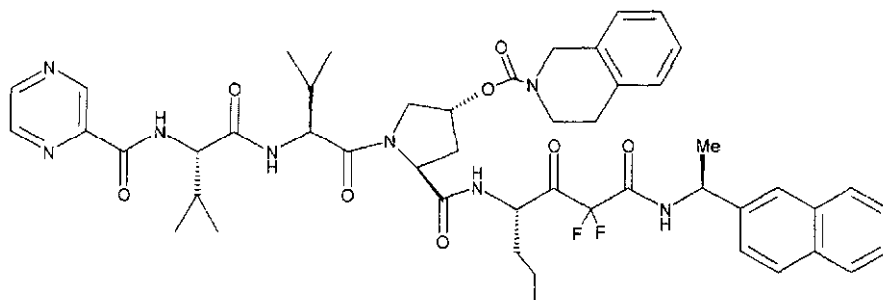
AM,



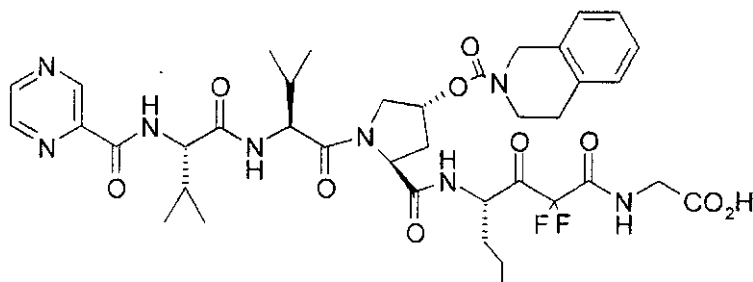
DK,



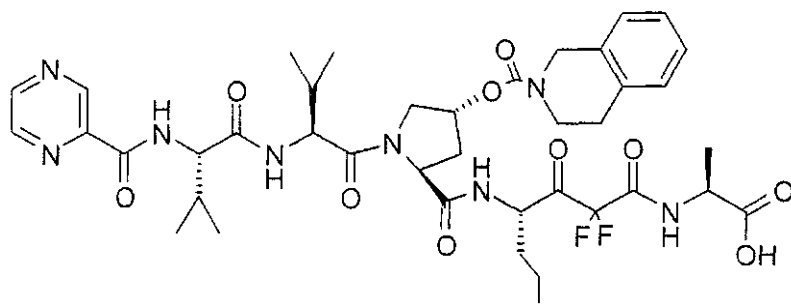
DL,



DM,

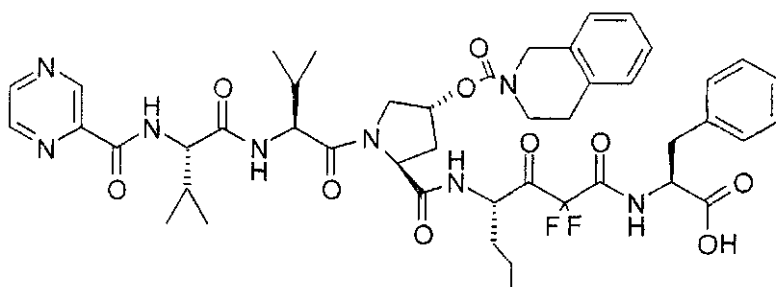


DO,



DP,

y



DQ,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de tal compuesto, su sal.

- 5 54. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto de las reivindicaciones 1 a 53 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
55. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 56. La composición farmacéutica de la reivindicación 55, que comprende adicionalmente un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en la que dicho compuesto es diferente a un interferón.
57. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 15 58. La composición farmacéutica de la reivindicación 56, en la que dicho compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, dicho interferón, y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C están presentes cada uno en una cantidad seleccionada entre el grupo que consiste en una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica, y una combinación de las mismas.
- 20 59. La composición farmacéutica de la reivindicación 58, en la que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón linfoblastoide, e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C se selecciona entre el grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN bicatenario, ARN bicatenario en complejo con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.
- 25 60. Un procedimiento para inhibir la proteasa de HCV que comprende poner en contacto la proteasa con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53.
61. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53.
- 30 62. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para tratar a un paciente que padece una infección por HCV o afecciones fisiológicas relacionadas con la infección, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 en combinación con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de otro agente terapéutico anti-HCV.

63. El compuesto para su uso de la reivindicación 62, en el que el agente terapéutico anti-HCV es interferón o interferón derivatizado.
- 5 64. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una infección por hepatitis C en un paciente que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 y un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C.
65. El compuesto para su uso de la reivindicación 64, en el que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz de dicha combinación comprende adicionalmente un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 10 66. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 y un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 15 67. El compuesto para su uso de la reivindicación 65, en el que dicho compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, dicho interferón, y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C están presente cada uno en una cantidad seleccionada entre el grupo que consiste en una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica, y una combinación de las mismas.
- 20 68. El compuesto para su uso de la reivindicación 67, en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón linfoblastoide, e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C se selecciona entre el grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN bicatenario, ARN bicatenario en complejo con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.
- 25 69. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 en combinación con un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesite.
- 30 70. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 en combinación con un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesite, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 35 71. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 en combinación con un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C y un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de infección por el virus de la hepatitis C en un paciente que lo necesite, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 40 72. El uso de acuerdo con la reivindicación 71, en el que dicho compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, dicho interferón, y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C están presentes cada uno en dicho medicamento en una cantidad seleccionada entre el grupo que consiste en una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica, y una combinación de las mismas.
- 45 73. El uso de acuerdo con la reivindicación 72, en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón linfoblastoide, e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C se selecciona entre el grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN bicatenario, ARN bicatenario en complejo con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.
74. Un kit o embalaje farmacéutico, que comprende una pluralidad de recipientes diferentes, en el que al menos uno de dichos recipientes contiene un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 y al menos otro de dichos recipientes contiene un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C.
- 50 75. Un kit o embalaje farmacéutico, que comprende una pluralidad de recipientes diferentes, en el que al menos uno de dichos recipientes contiene un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 y al menos otro de dichos recipientes contiene un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.
- 55 76. Un kit o embalaje farmacéutico, que comprende una pluralidad de recipientes diferentes, en el que al menos uno de dichos recipientes contiene un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, al menos otro de dichos recipientes contiene un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, y al menos otro de dichos

recipientes contiene un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.

5 77. El kit o embalaje farmacéutico de la reivindicación 76, en el que dicho compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, dicho interferón, y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C están presentes cada uno en una cantidad seleccionada entre el grupo que consiste en una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica, y una combinación de las mismas.

10 78. El kit o embalaje farmacéutico de la reivindicación 77, en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón linfoblastoide, e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C se selecciona entre el grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN bicatenario, ARN bicatenario en complejo con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.

15 79. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula, un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, y un interferón que tiene actividad antiviral de la hepatitis C.

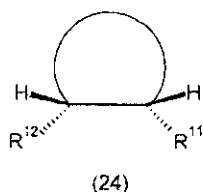
80. El compuesto para su uso de la reivindicación 79, que comprende adicionalmente poner en contacto dicha célula y un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.

20 81. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 para su uso en un procedimiento para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula, un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, y un compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C, en el que dicho compuesto es diferente a un interferón.

25 82. El compuesto para su uso de la reivindicación 79, en el que dicho compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, dicho interferón, y dicho compuesto que tiene actividad de la hepatitis C están presentes cada uno en una cantidad seleccionada entre el grupo que consiste en una cantidad farmacéuticamente eficaz, una cantidad farmacéuticamente eficaz subclínica, y una combinación de las mismas.

30 83. El compuesto para su uso de la reivindicación 82, en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón consenso, interferón alfa 2A, interferón linfoblastoide, e interferón tau; y dicho compuesto que tiene actividad antiviral de la hepatitis C se selecciona entre el grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares tipo 1, ARN bicatenario, ARN bicatenario en complejo con tobramicina, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.

84. Un compuesto de fórmula 24



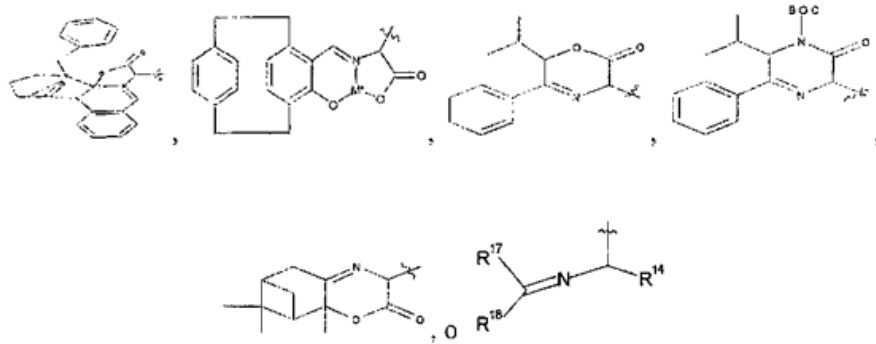
35 en la que:



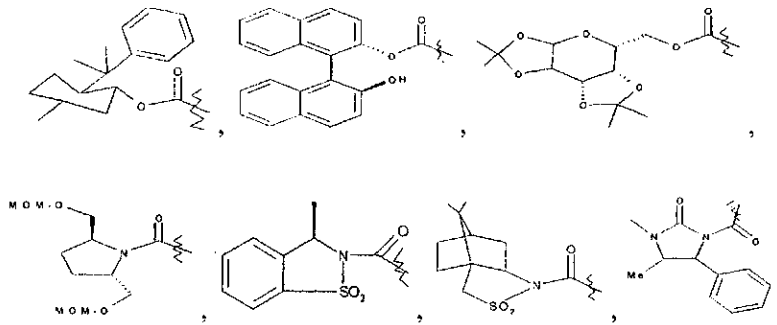
es ciclopentilo;

Rⁿ es -CO₂R¹³;

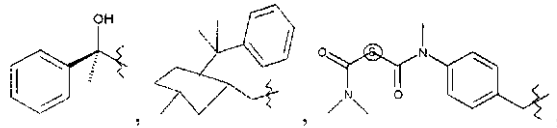
R¹² es un producto de adición derivado de glicinimida imínica seleccionado entre el grupo de fórmulas



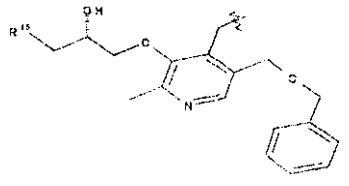
en la que:
 R^{14} es $-CO_2R^{16}$, $-CN$;



5 o $-CONR^{15}R^{15}$;
 R^{15} es un grupo alifático;
 R^{16} es un grupo protector de ácido, arilo, o grupo alifático; R^{17} es arilo, grupo alifático,

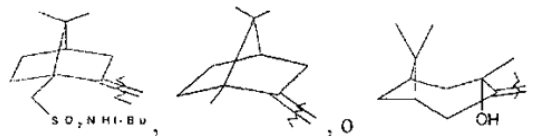


o



10

R^{18} es hidrógeno, alquilo, o alquiltio; o arilo;
 R^{17} y R^{18} tomados junto con el carbono al que R^{17} y R^{18} están unidos forman



15 y \odot es una fase sólida; y
 R^{13} es un grupo protector de ácido o grupo alifático.

85. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 84 en el que R^{11} es $-CO_2R^{13}$.

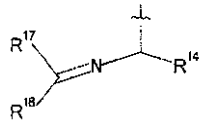
86. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84 en el que R^{13} es un grupo alifático.

87. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84 a 86 en el que R^{13} es un grupo alquilo.

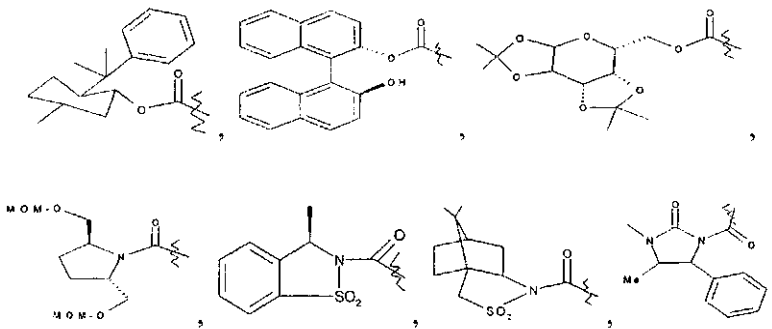
88. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84 a 87 en el que R^{13} es alquilo inferior.

89. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84 a 88 en el que R^{13} es metilo.

5 90. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84 a 89 en el que R^{12} es en el que:



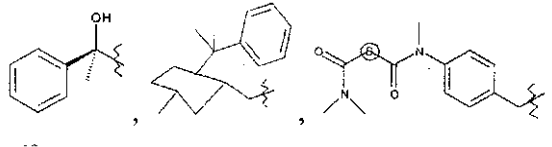
R^{14} es $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$, $-\text{CN}$;



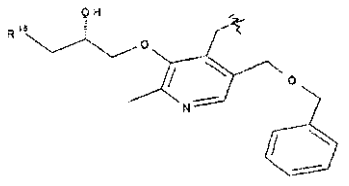
o $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

10 R^{15} es un grupo alifático;

R^{16} es un grupo protector de ácido, arilo, o grupo alifático; R^{17} es arilo, grupo alifático,

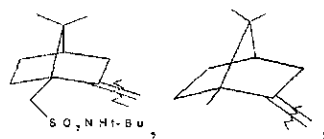


o

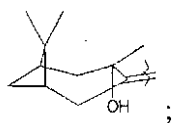


15 R^{18} es hidrógeno, alquilo, o alquiltio; o arilo;

R^{17} y R^{18} tomados junto con el carbono al que R^{17} y R^{18} están unidos

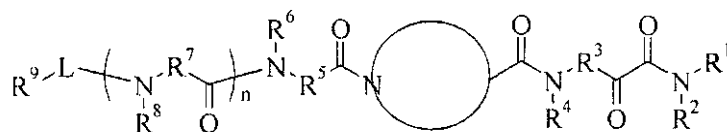


o



y $\text{\textcircled{S}}$ es una fase sólida.

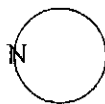
91. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 90 en el que R^{14} es $-\text{CO}_2R^{16}$.
- 5 92. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 90 o 91 en el que R^{16} es alifático.
93. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 90 a 92 en el que R^{16} es alquilo.
94. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 90 a 93 en el que R^{16} es alquilo inferior.
95. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 90 a 94 en el que R^{16} es t-Bu.
96. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 90 a 95 en el que R^{17} es arilo.
- 10 97. Un compuesto de cualquier de las reivindicaciones 90 a 96 en el que R^{17} es fenilo.
98. Un compuesto de cualquier de las reivindicaciones 90 a 97 en el que R^{18} es arilo.
99. Un compuesto de cualquier de las reivindicaciones 90 a 98 en el que R^{18} es fenilo.
100. Un compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula estructural:



15 en la que:

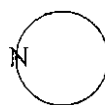
- R^1 es hidrógeno, grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
- R^2 y R^9 son cada uno independientemente un grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido;
- 20 R^3 , R^5 y R^7 son cada uno independientemente metanodilo o etanodilo, sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido y en el que el metanodilo o etanodilo está además opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo alifático;
- R^4 , R^6 , R^8 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno o grupo alifático opcionalmente sustituido;

25

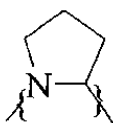


es azaheterociclilo monocíclico sustituido;
L es $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$ o $-\text{NR}^{10}\text{S}(\text{O})_2-$; y
n es 0 o 1, o

30 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal, con la condición de que cuando



Está sustituido



entonces L es $-\text{OC}(\text{O})-$ y R^9 es un grupo alifático opcionalmente sustituido, o al menos uno de R^3 , R^5 y R^7 es metanodiilo o etanodiilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo alifático opcionalmente sustituido, un grupo cíclico opcionalmente sustituido o un grupo aromático opcionalmente sustituido y en el que el metanodiilo o etanodiilo está además opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo alifático, o R^4 es un grupo alifático opcionalmente sustituido.

101. Un compuesto de la reivindicación 100 en el que:

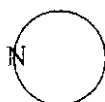
grupos alifáticos opcionalmente sustituidos son alquilo, alquenilo o alquinilo, opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo alifático;

grupos cíclicos opcionalmente sustituidos son grupos cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o heterociclenilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

grupos aromáticos opcionalmente sustituidos son grupos arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) cicloalquilenos opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

grupos (1,1- o 1,2) heterociclenos opcionalmente sustituidos son grupos (1,1- o 1,2) heterociclenos opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo de anillo;



como azaheterociclilo monocíclico sustituido es un grupo azaheterociclilo monocíclico sustituido directamente o a través de un grupo de unión por al menos un sustituyente seleccionado entre arilo, heteroarilo, ariloxi, heteroariloxi, aroílo o su análogo tio, heteroarilo o su análogo tioxo, aroiloxi, heteroaroiloxi, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, arilsulfinilo, heteroarilsulfinilo, ariltio, heteroariltio, arildiazo, heteroarildiazo, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$ o $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$ en los que al menos uno de Y^1 e Y^2 es arilo o heteroarilo, en el que dicho grupo de unión se selecciona entre el grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquenilo inferior, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{NR}^{80}-$, en el que R^{80} es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heteroarilo;

azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido es un grupo azaheterociclilo multicíclico opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido es un grupo azaheterociclenilo multicíclico opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes de grupo de anillo;

en el que:

sustituyentes de grupo alifático significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, cicliilcarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, cicliilcarboniloxi, aroiloxi, heteroaroiloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), $-\text{C}(\text{O})-\text{NHOH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CN}$, sulfuro, fosfeno, alquilsulfonilcarbamoílo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoílo, N-metoxicarbamoílo, heteroarilsulfonilcarbamoílo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, alcoxycarbonilo, cicliiloxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfinilo, cicliilsulfinilo, arilsulfinilo, heteroarilsulfinilo, alquiltio, cicliiltio, ariltio, heteroariltio, cicliilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, metileno ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$), oxo ($\text{O}=\text{}$), tioxo ($\text{S}=\text{}$), $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, o $\text{Y}^3\text{SO}_2\text{NY}^1-$ en el que R^2 es tal como se define aquí, Y^1 e Y^2 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y^3 es alquilo, cicloalquilo arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}-$, entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, cicliilcarbonilo, aroílo, heteroaróilo, alcoxycarbonilo, cicliiloxicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{O}-$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC}(\text{O})\text{NY}^3-$ o $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros;

sustituyentes de grupo de anillo significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclioxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo o su análogo tioxo, cicliilcarbonilo o su análogo tioxo, aroílo o su análogo tioxo, heteroaróilo o su análogo tioxo, aciloxi, cicliilcarboniloxi, aroiloxi, heteroaroiloxi, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), bioisómero de ácido, alcoxycarbonilo, cicliiloxicarbonilo, ariloxicarbonilo, heteroariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, cicliilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfinilo, cicliilsulfinilo, arilsulfinilo,

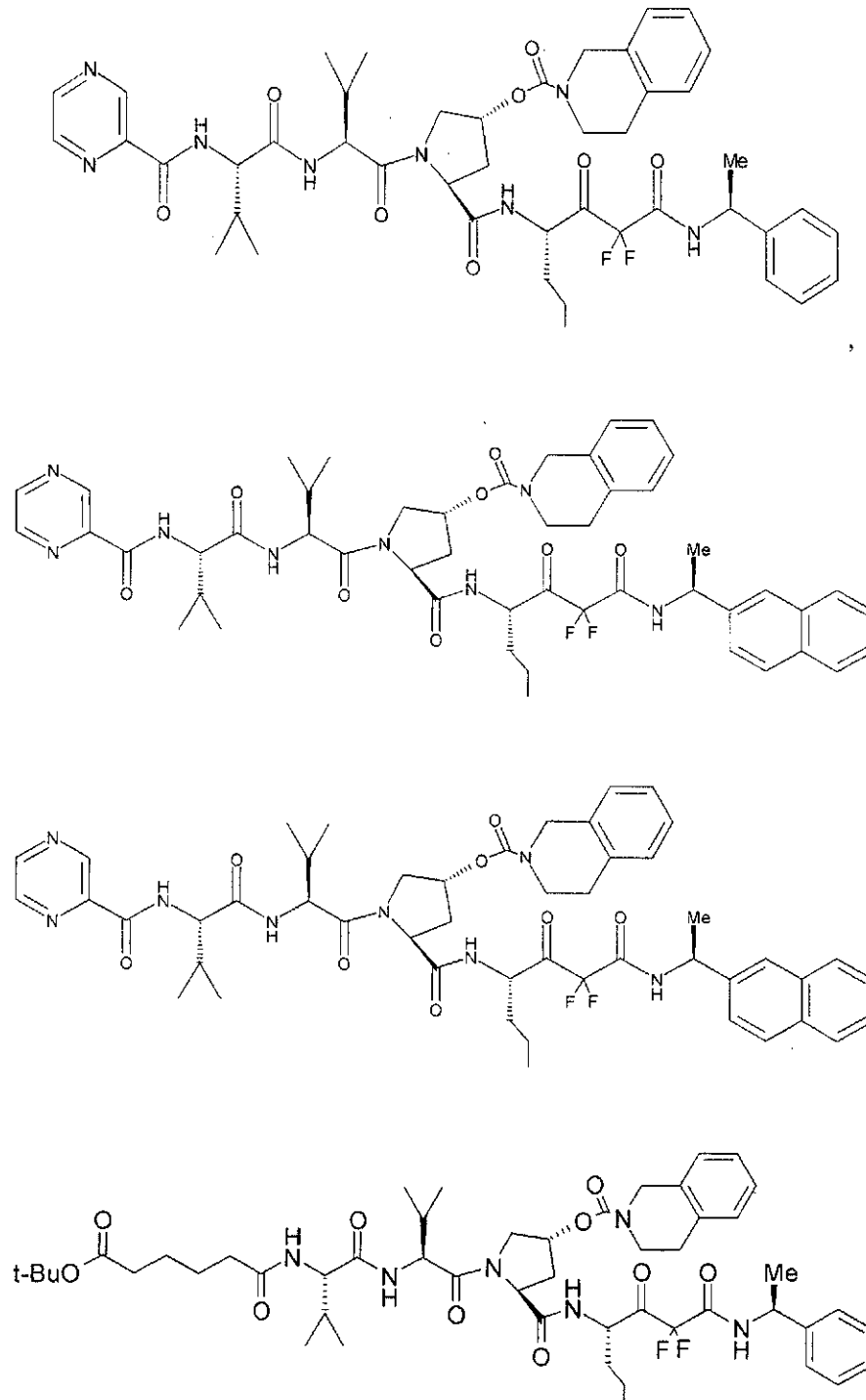
heteroarilsulfínico, alquiltio, cicliltio, ariltio, heteroariltio, ciclilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, en el que Y^1 , Y^2 e Y^3 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es Y^1Y^2N- , entonces uno de Y^1 e Y^2 puede ser acilo, ciclicarbonilo, aróilo, heteroaróilo, alcocarbonilo, ciclioxicarbonilo, ariloxicarbonilo o heteroariloxicarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y^1 e Y^2 es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ o $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 e Y^2 también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y^1 e Y^2 están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros, o cuando un sistema de anillo está saturado o parcialmente saturado, los "sustituyentes de grupo de anillo" incluyen además, metileno ($H_2C=$), oxo ($O=$) y tioxo ($S=$); arilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono; cicloalquilo significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono; cicloalquenilo significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono; ciclilo significa cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo o heterociclenilo; heterociclilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico saturado no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono; heterociclenilo significa un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico o multicíclico no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno; y heteroarilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono.

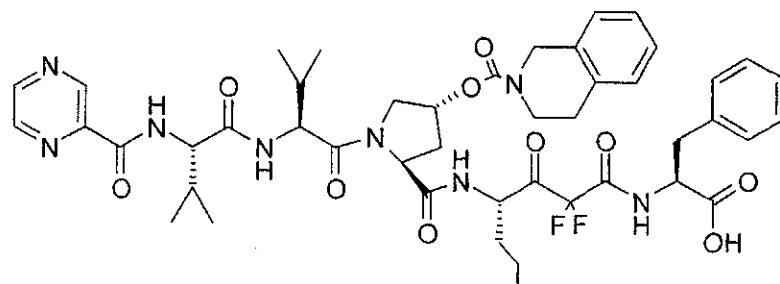
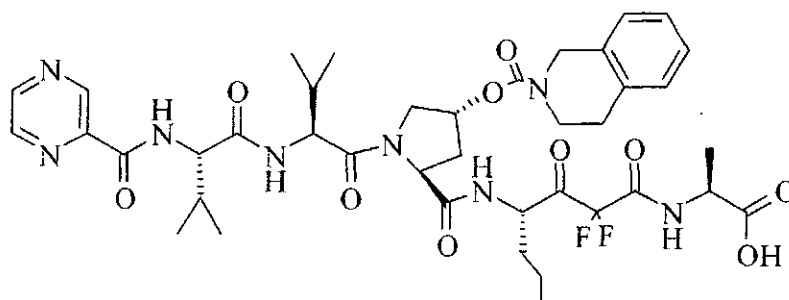
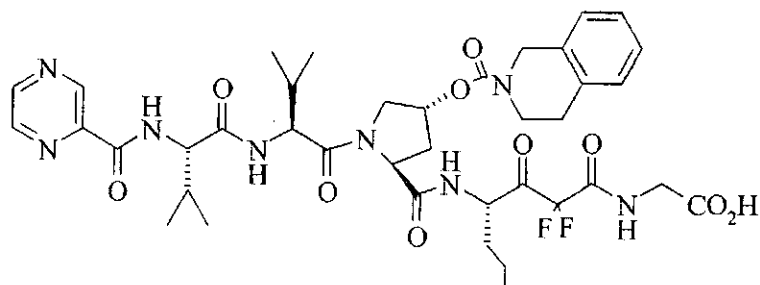
102. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 101 en el que R^2 es 1-carboxi-2-feniletilo, ciclopropilo, carboximetilo, ciclobutilo, 1-feniletilo, but-2-ilo, 1-pirid-4-iletilo, o propen-3-ilo.
103. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 102 en el que R^3 es metanodiílo de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
104. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 103 en el que R^3 es metanodiílo de grupo (alquilo o alquenilo inferior) opcionalmente halosustituido.
105. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 104 en el que R^3 es propilmetanodiílo, 2,2-difluoroetilmetanodiílo, 2,2,2-trifluorometanodiílo o propen-3-ilmetanodiílo; R^3 más preferente es propilmetanodiílo, 2,2-difluoroetilmetanodiílo.
106. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 105 en el que R^5 es metanodiílo de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido.
107. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 106 en el que R^5 es metanodiílo (de alquilo o alquenilo inferior) opcionalmente (fenil-, carboxi-, carboxamido- o alcocarbonil) sustituido.
108. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 107 en el que R^5 es metilmetanodiílo, isopropilmetanodiílo, t-butilmetanodiílo, but-2-ilmetanodiílo, butilmetanodiílo, bencilmetanodiílo, 3-metilbutilmetanodiílo, 2-metilpropilmetanodiílo, carboximetilmetanodiílo, carboxamidometilmetanodiílo, benciloxicarbonilmetil-metanodiílo, benciloxicarbonilpropilmetanodiílo, fenilpropen-3-ilmetanodiílo.
109. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 108 en el que R^7 es metanodiílo de grupo alifático inferior opcionalmente sustituido o metanodiílo de grupo cíclico inferior opcionalmente sustituido.
110. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 109 en el que R^7 es alquilmetanodiílo inferior opcionalmente sustituido o cicloalquilmetanodiílo inferior opcionalmente sustituido.
111. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 110 en el que R^7 es isopropilmetanodiílo o ciclohexilmetanodiílo.
112. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 111 en el que R^9 es alquilo inferior opcionalmente (carboxi-, (alquilo inferior)HNCO-, hidroxil-, fenilo o heteroaril) sustituido o heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido.
113. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 112 en el que R^9 es isopropilo o t-butilo.
114. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 100 a 113 en el que R^9 se selecciona entre el grupo que consiste en:

opcionalmente sustituido,

en el que Ar es R² que comprende un sustituyente/resto aromático.

116. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:





117. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que:

R⁰ es un enlace;

R¹ es hidrógeno;

5 R² es alquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático; o cicloalquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;

R³ y R⁵ son cada uno independientemente metileno opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático;

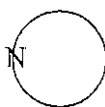
R⁴, R⁶, R⁸ y R¹⁰ son hidrógeno;

10 R⁷ es metileno sustituido con cicloalquilo, alquilo inferior o arilo; o (1,1- o 1.2-) cicloalqueno opcionalmente sustituido con cicloalquilo, alquilo inferior o arilo;

R⁹ es

alquilo inferior opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo alifático; o heteroarilo opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;

15 o heterocíclico opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico;

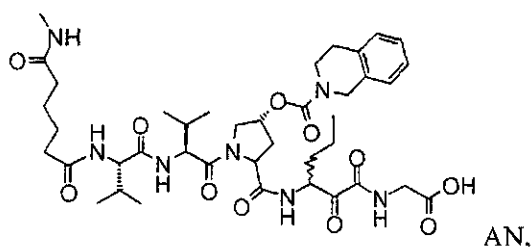


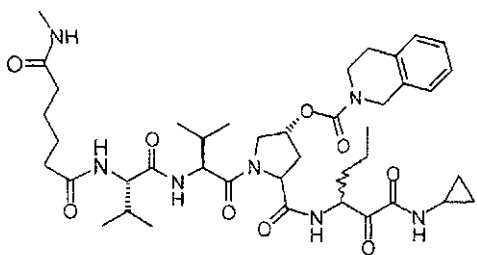
es azaheterociclilo monocíclico opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes de grupo cíclico; y L es -C(O)-, -OC(O)-.

118. Un compuesto de la reivindicación 117 en el que:

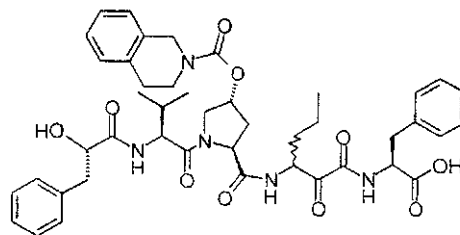
5 sustituyentes de grupo alifático significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclilo, arilo, heteroarilo, acilo o su análogo tioxo, ciclilcarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo, heteroarilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclilcarbonilo, aroilo, heteroarilo, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfona, alquilsulfonilcarbamoilo, tetrazolilo, arilsulfonilcarbamoilo, N-metoxicarbamoilo, heteroarilsulfonilcarbamoilo, 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidinilo o hidroxiheteroarilo tal como 3-hidroxiisoxazolilo, 3-hidroxi-1-metilpirazolilo, alcoxycarbonilo, cicliloxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxycarbonilo, alquilsulfonilo, ciclilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, ciclilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, cicliltio, ariltio, heteroariltio, ciclilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, metileno (H₂C=), oxo (O=), tioxo (S=), Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³-, Y¹Y²NSO₂-, o Y³SO₂NY¹- en el que R² es tal como se define aquí, Y¹ e Y² son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, e Y³ es alquilo, cicloalquilo arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es Y¹Y²N-, entonces uno de Y¹ e Y² puede ser acilo, ciclilcarbonilo, aroilo, heteroarilo, alcoxycarbonilo, cicliloxycarbonilo, ariloxycarbonilo o heteroariloxycarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y¹ e Y² es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, Y¹ e Y² también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y¹ e Y² están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros; sustituyentes de grupo de anillo significa arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi, ciclilo, arilo, heteroarilo, acilo o su análogo tioxo, ciclilcarbonilo o su análogo tioxo, aroilo o su análogo tioxo, heteroarilo o su análogo tioxo, aciloxi, ciclilcarbonilo, aroilo, heteroarilo, halo, nitro, ciano, carboxi (ácido), bioisómero de ácido, alcoxycarbonilo, cicliloxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heteroariloxycarbonilo, alquilsulfonilo, ciclilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, ciclilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, cicliltio, ariltio, heteroariltio, ciclilo, arildiazo, heteroarildiazo, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, en el que Y¹, Y² e Y³ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo, o cuando el sustituyente es Y¹Y²N-, entonces uno de Y¹ e Y² puede ser acilo, ciclilcarbonilo, aroilo, heteroarilo, alcoxycarbonilo, cicliloxycarbonilo, ariloxycarbonilo o heteroariloxycarbonilo, tal como se define aquí y el otro de Y¹ e Y² es tal como se ha definido previamente, o cuando el sustituyente es Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- o Y¹Y²NSO₂-, Y¹ e Y² también pueden tomarse junto con el átomo de N a través del cual Y¹ e Y² están unidos para formar un azaheterociclilo o azaheterociclenilo de 4 a 7 miembros, o cuando un sistema de anillo está saturado o parcialmente saturado, los "sustituyentes de grupo de anillo" incluyen además, metileno (H₂C=), oxo (O=) y tioxo (S=); arilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono; cicloalquilo significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono; cicloalqueno significa un sistema de anillo mono- o multicíclico, no aromático de 3 a 10 átomos de carbono que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono; ciclilo significa cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo o heterociclenilo; heterociclilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico saturado no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono; y heteroarilo significa un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en el que uno o más de los átomos de carbono en el sistema de anillo es/son hetero-elemento o elementos distintos de carbono.

119. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:

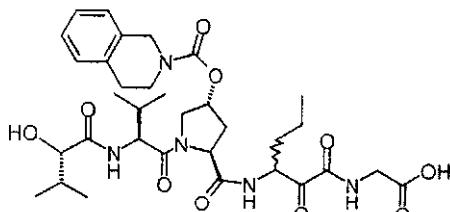




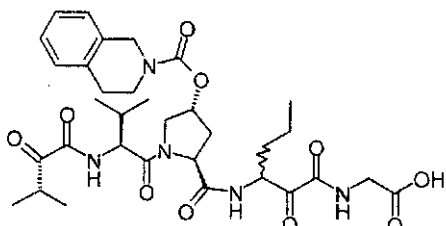
AO,



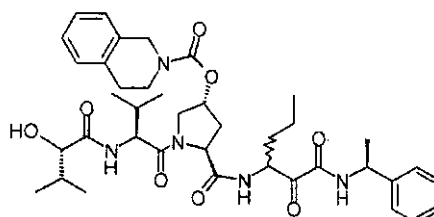
BH,



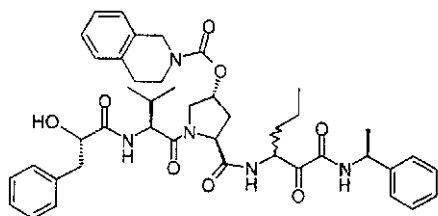
BI,



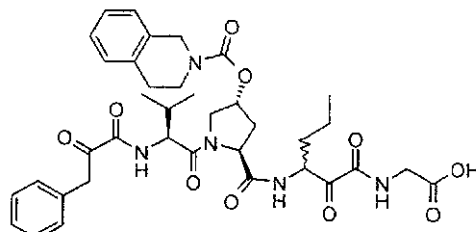
BJ,



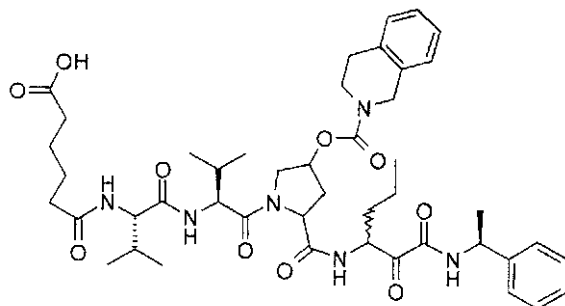
BN,



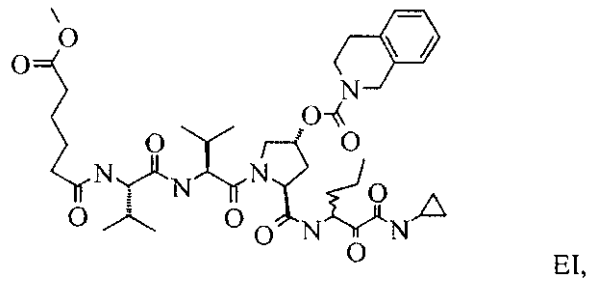
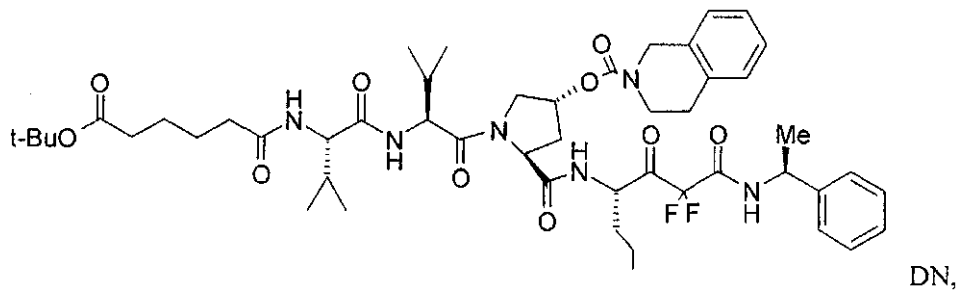
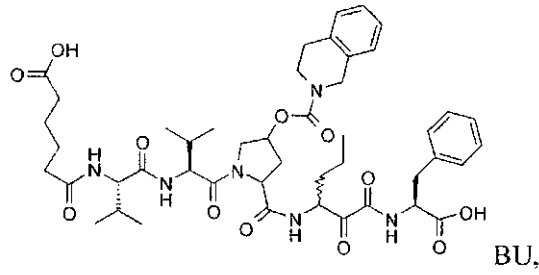
BO,



BS,



BT,



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de un compuesto de este tipo, su sal.

- 5 120. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 117 o 118 en el que el grupo alifático opcionalmente sustituido, grupo cíclico opcionalmente sustituido o grupo aromático opcionalmente sustituido de R⁹ está sustituido con al menos un sustituyente de heteroarilo.
121. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 117 o 118 en el que el grupo aromático opcionalmente sustituido de R⁹ es heteroarilo opcionalmente sustituido.
122. Un compuesto de la reivindicación 120 en el que el grupo alifático opcionalmente sustituido de R⁹ es alquilheteroarilo opcionalmente sustituido.

Figura 1.

Tratamiento de combinación con interferón alfa-2B y compuesto CU

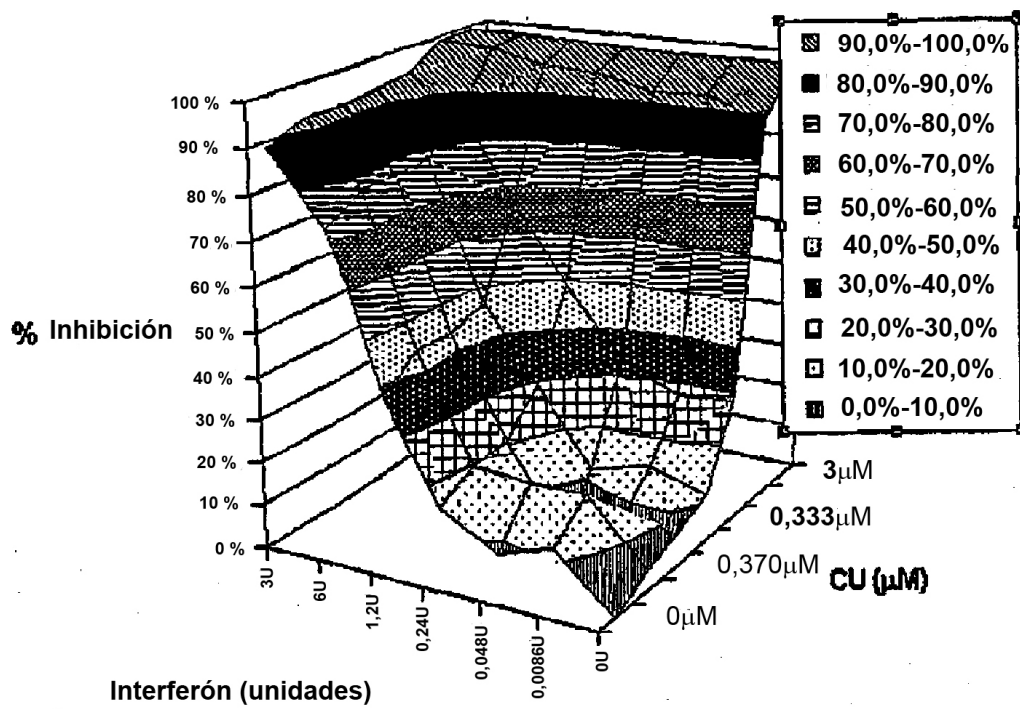


Fig 2.

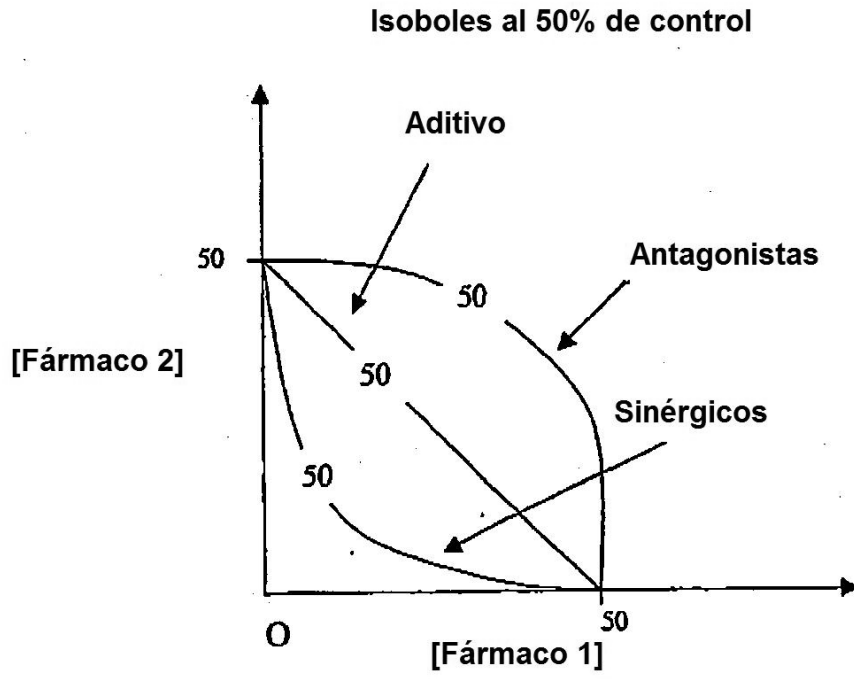


Fig. 3.

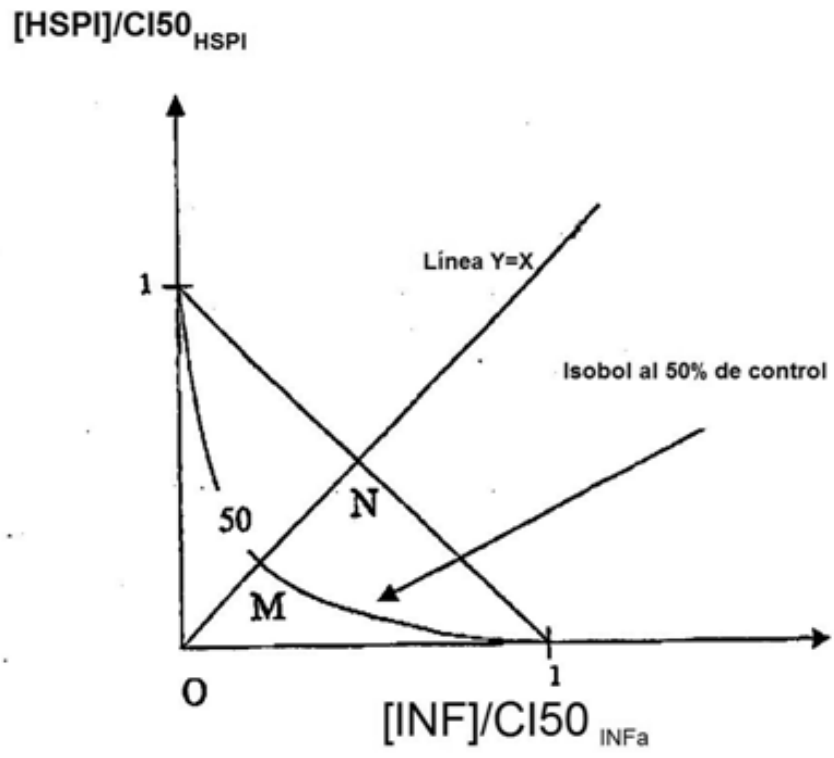


Fig. 4.

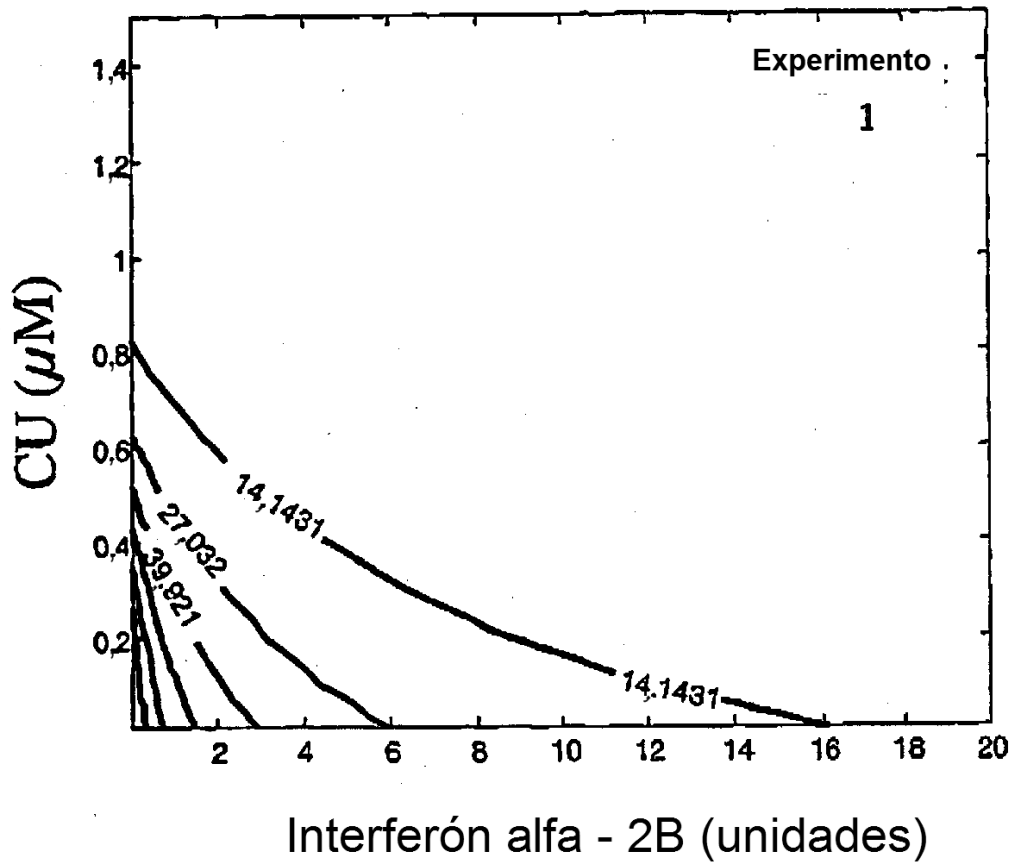


Fig. 5

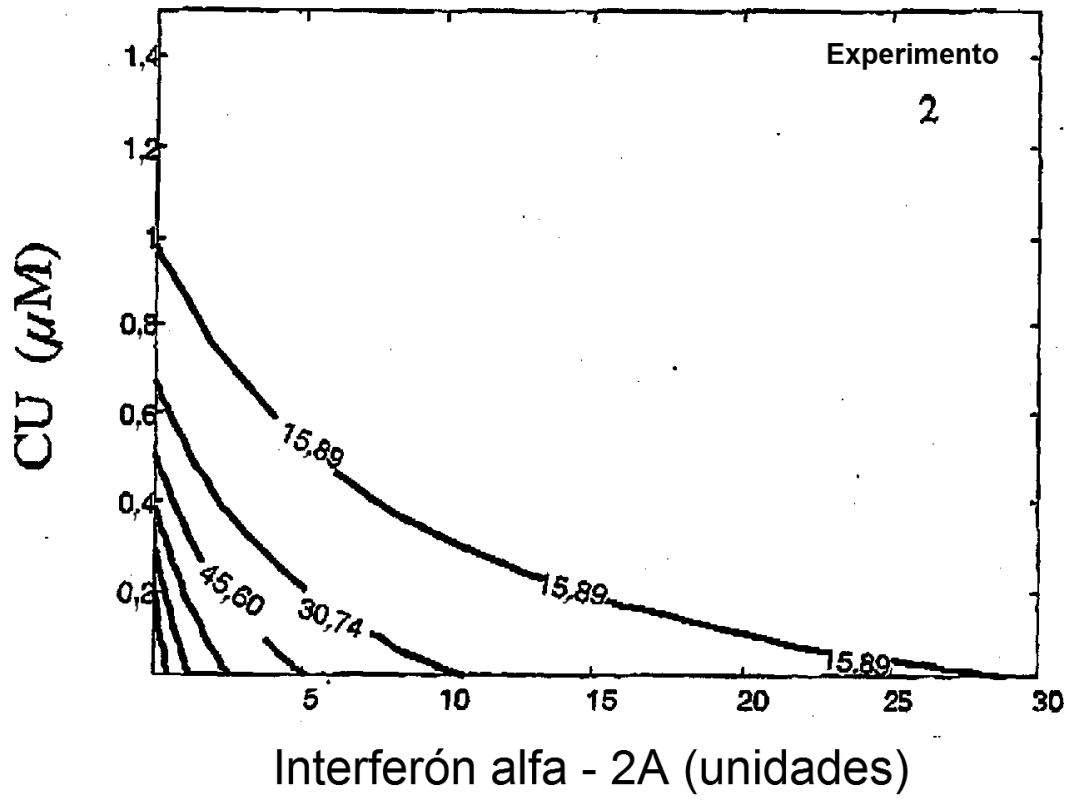


Fig. 6

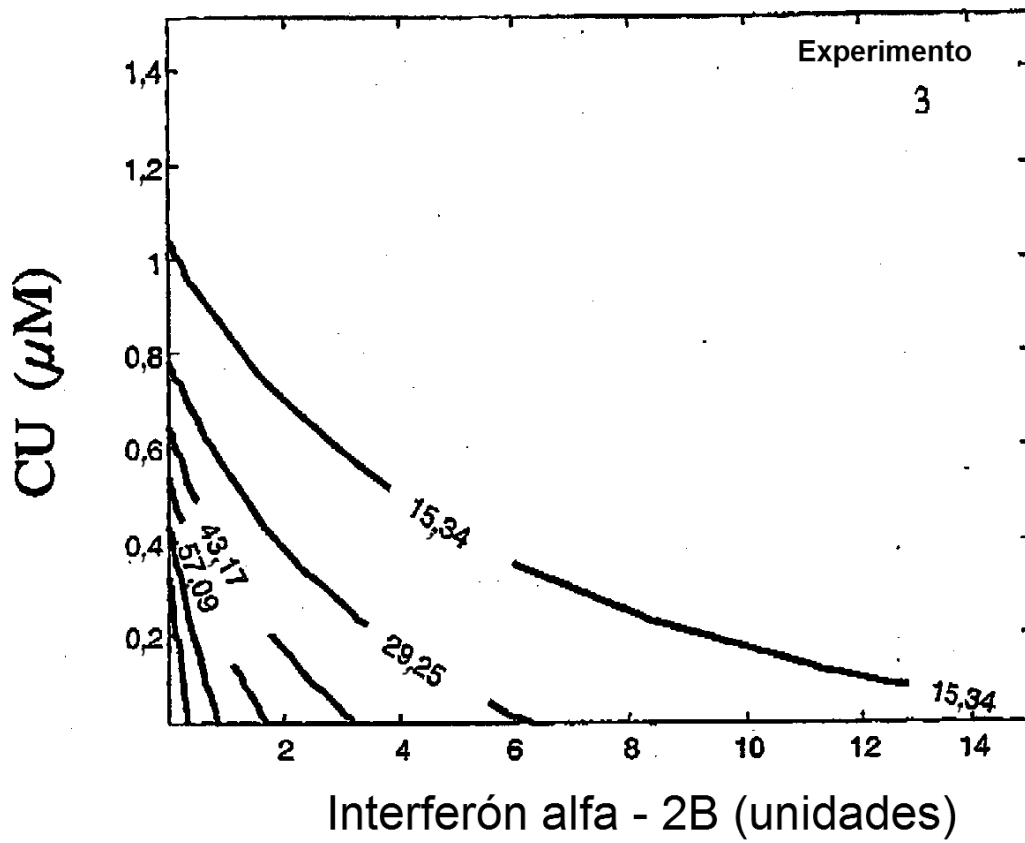


Fig. 7

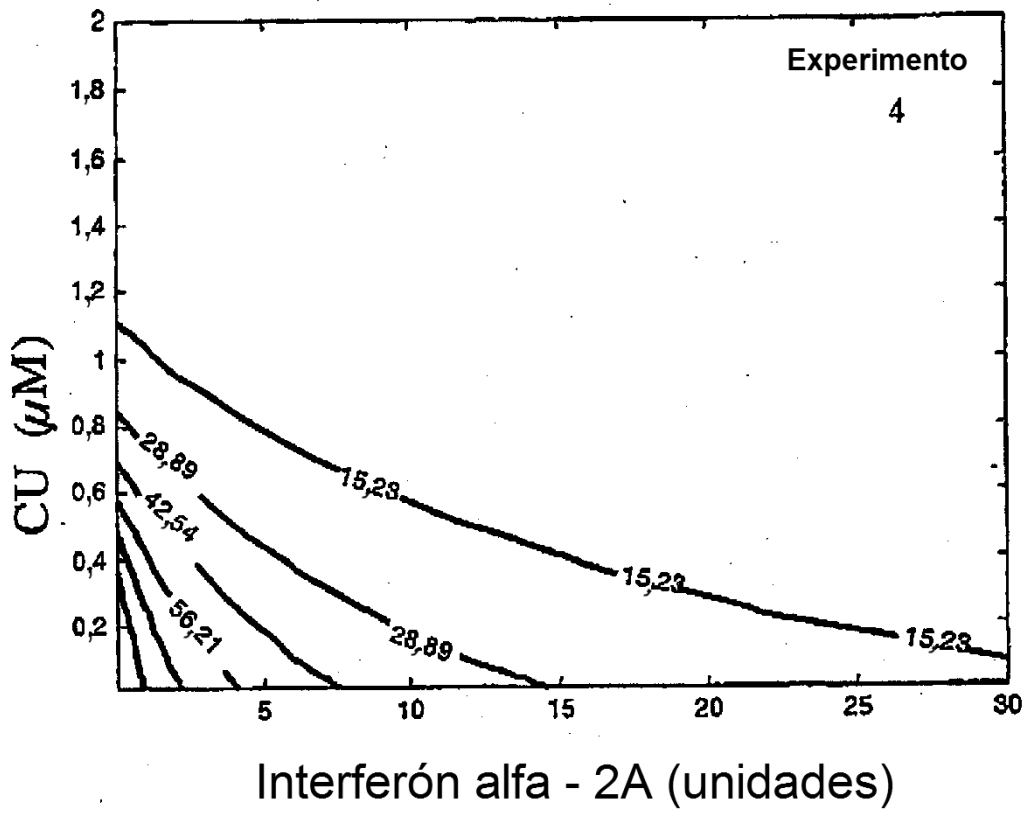


Fig. 8.

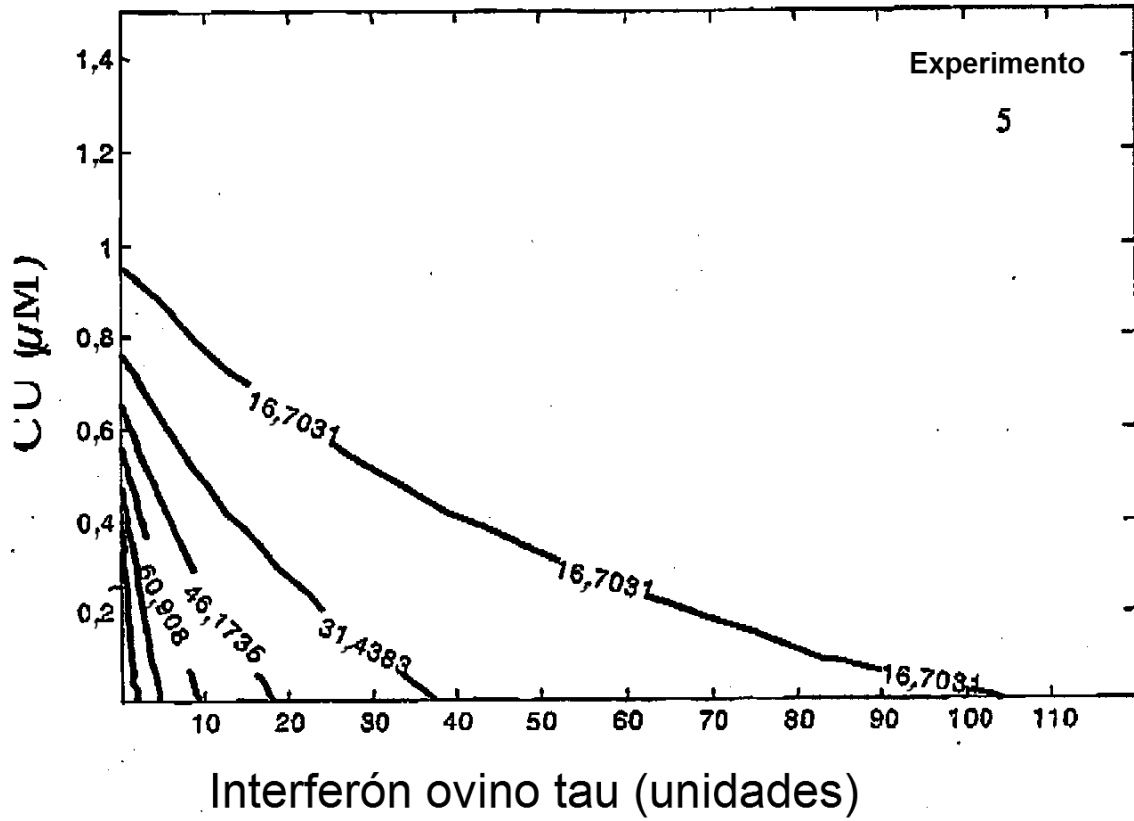


Fig 9.

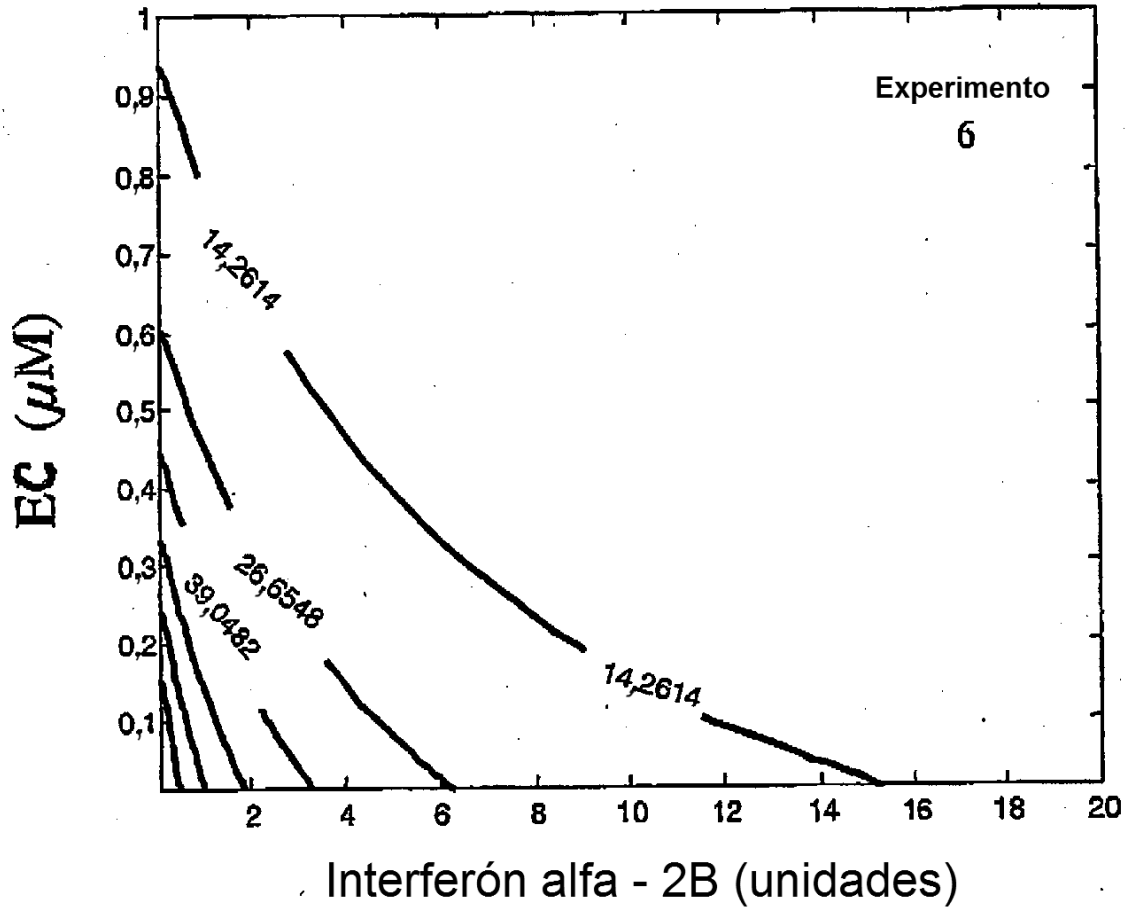


Fig. 10.

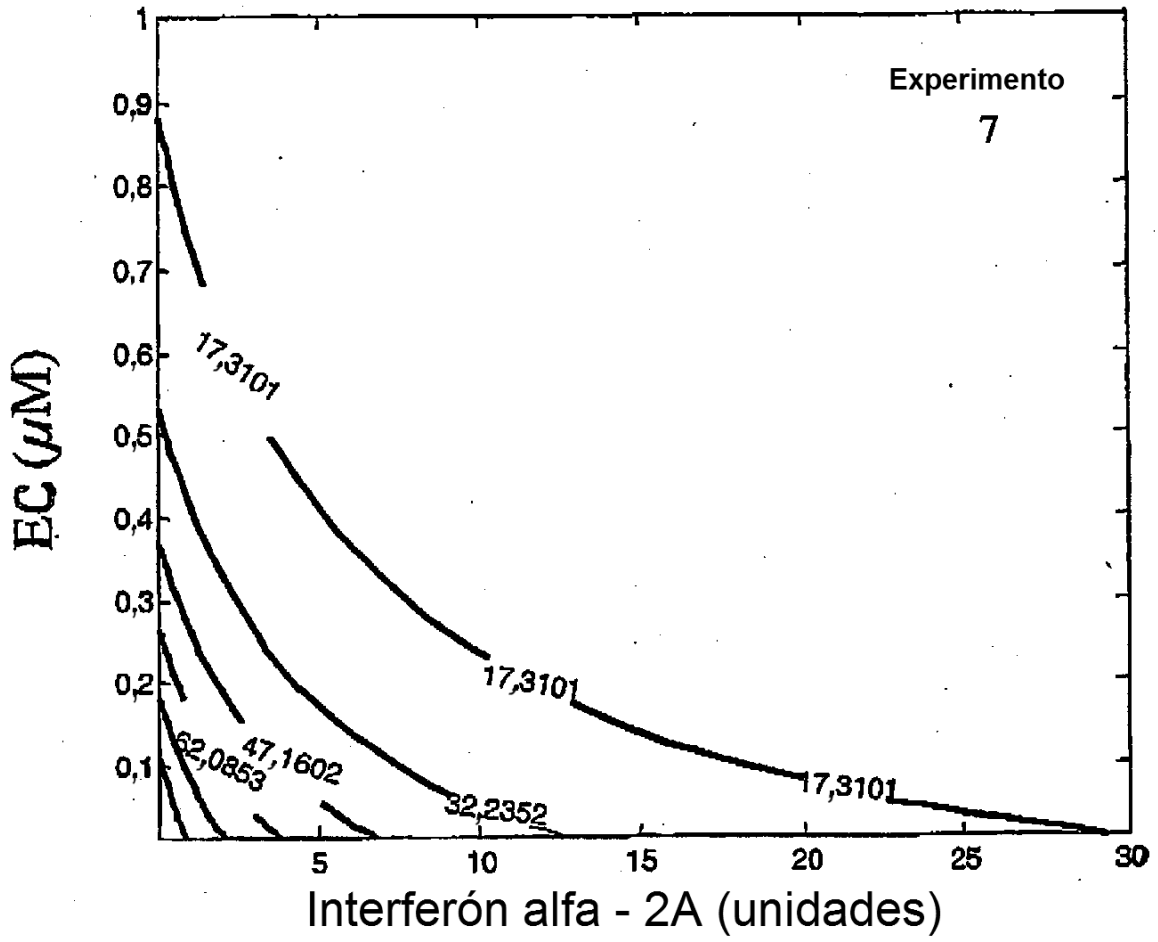


Fig 11.

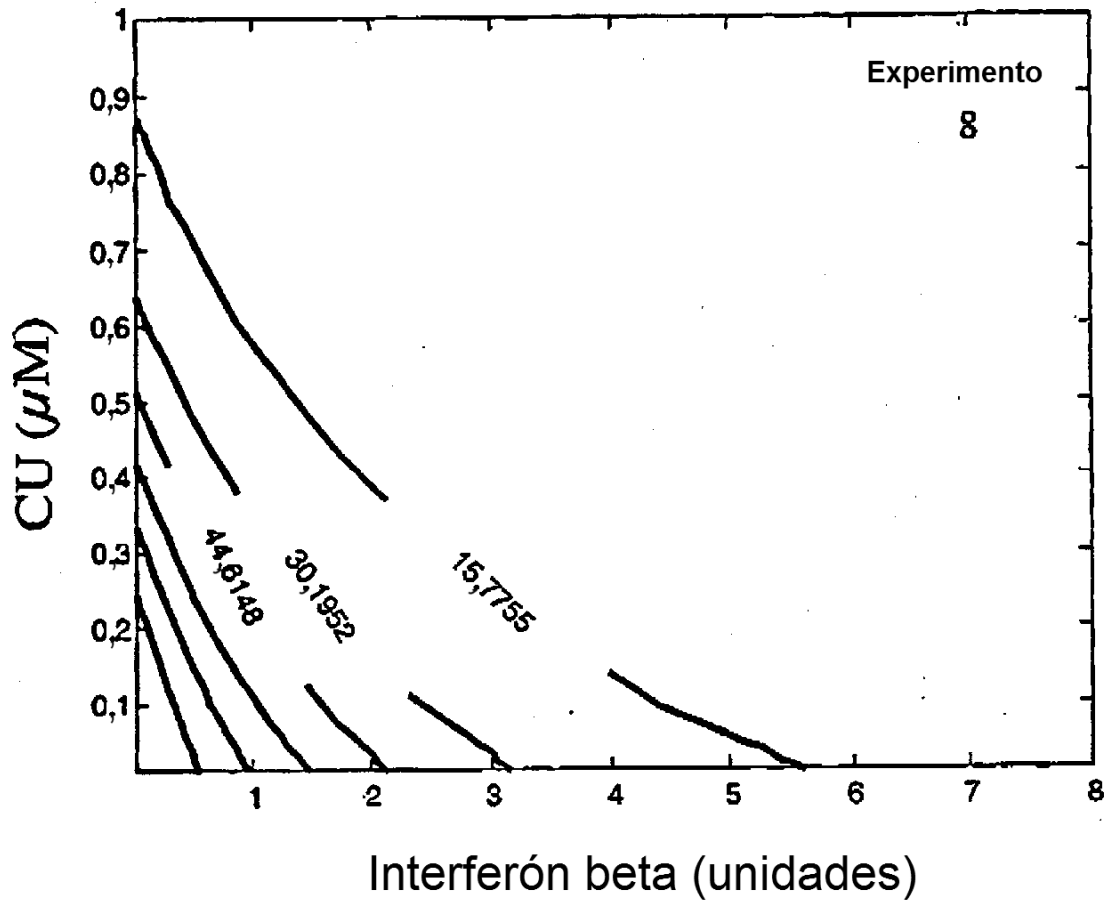


Fig. 12.

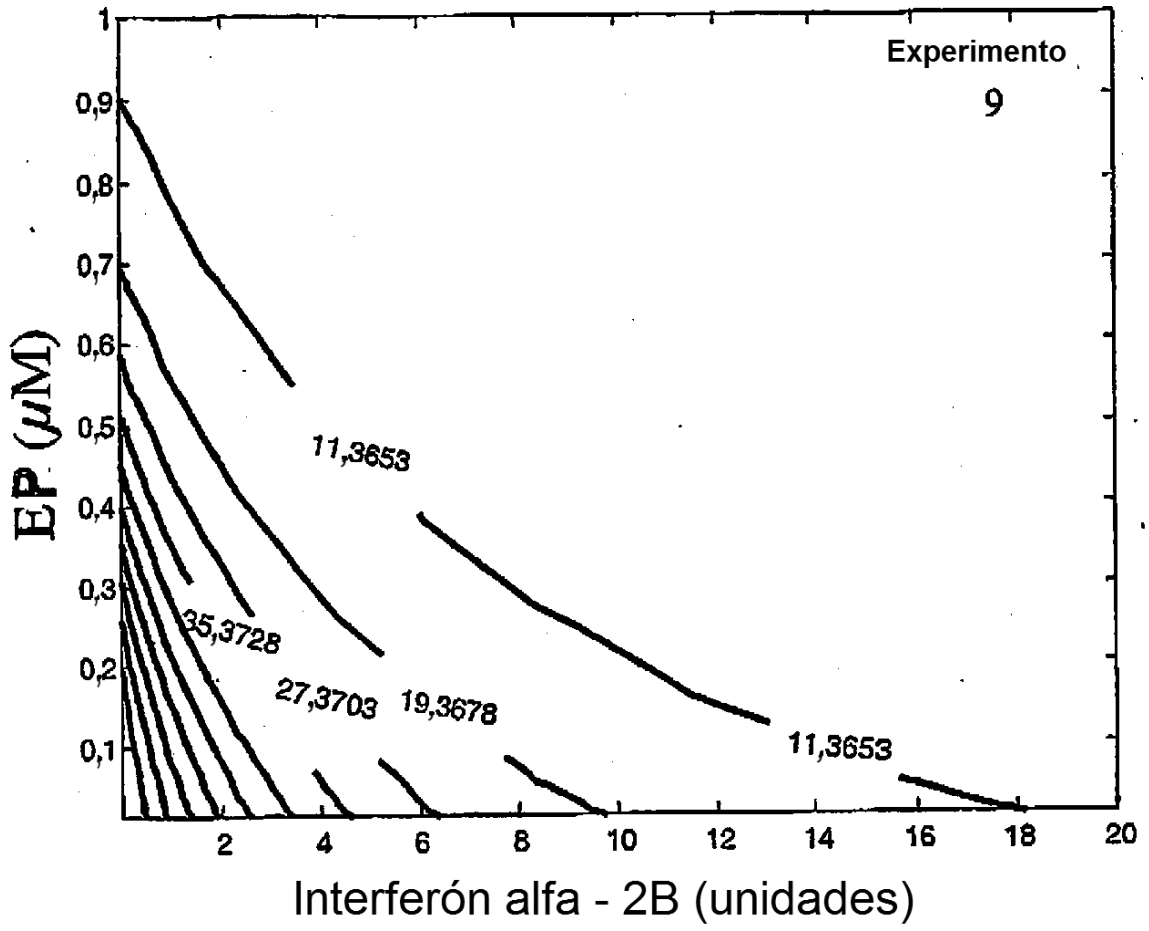


Fig 13.

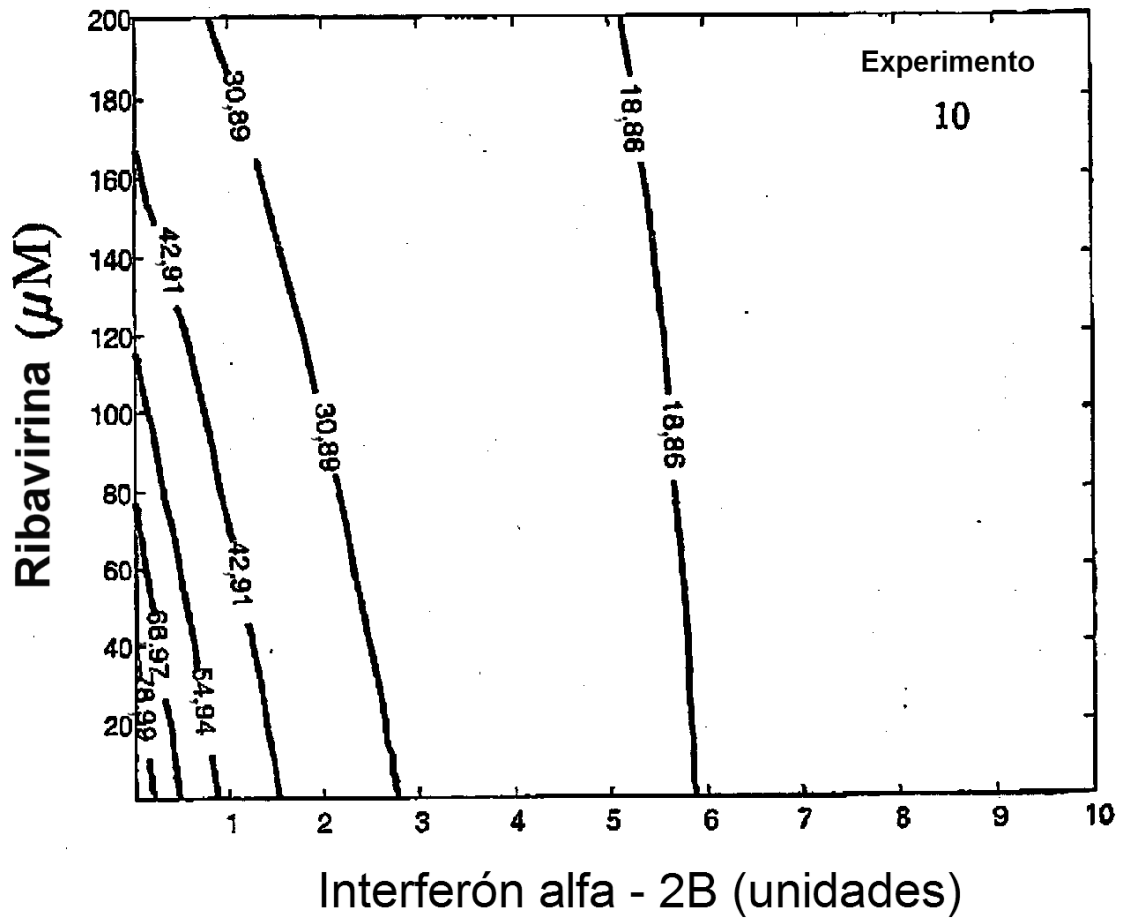


Fig. 14

