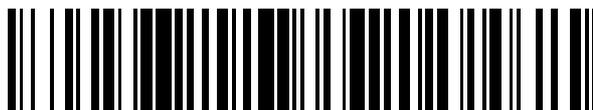


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 342**

51 Int. Cl.:

C07D 401/10 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11746520 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2603501**

54 Título: **Compuestos heterocíclicos antivirales**

30 Prioridad:

13.08.2010 US 373434 P

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

16.07.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LI, JIM y
TALAMAS, FRANCISCO XAVIER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 477 342 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos heterocíclicos antivirales

5 La presente invención proporciona compuestos no nucleósidos que son inhibidores de la polimerasa viral de RNA dependiente de RNA de HCV. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de las infecciones virales de RNA dependientes de RNA. Son especialmente útiles como inhibidores de la polimerasa NS5B del virus de la hepatitis C (HCV), como inhibidores de la replicación del HCV y para el tratamiento de la infección de la hepatitis C.

10 El virus de la hepatitis C es la principal causa de enfermedades hepáticas crónicas en todo el mundo (Boyer, N. y col., J. Hepatol. 32, 98-112, 2000). Los pacientes infectados con el HCV corren el riesgo de desarrollar cirrosis hepática y sufrir el consiguiente carcinoma hepatocelular, por ello el HCV es la principal indicación para el trasplante de hígado.

15 Se ha clasificado el HCV como perteneciente al grupo de los virus llamados *Flaviviridae* que incluye los géneros de los flavivirus, pestivirus y hapeceivirus, que incluye los virus de la hepatitis C (Rice, C.M., *Flaviviridae: The viruses and their replication*; en: Fields Virology, coordinadores: B.N. Fields, D.M. Knipe y P.M. Howley, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., capítulo 30, 931-959, 1996). El HCV es un virus con envoltura que contiene un genoma de RNA de hebra simple y sentido positivo de aproximadamente 9,4 kb. El genoma vírico contiene una
20 región 5' no traducida (UTR), un marco largo de lectura abierto, que codifica al producto previo de síntesis de una poliproteína, de aproximadamente 3011 aminoácidos y una región 3' UTR corta.

Con el análisis genético del HCV se han identificado seis genotipos principales que difieren en más del 30% de la secuencia del DNA. Se han diferenciado más de 30 subtipos. En EE.UU., aproximadamente el 70% de los individuos
25 infectados tienen la infección de tipo 1a y 1b. El tipo 1b es el subtipo predominante en Asia (X. Forn y J. Bukh, Clinics in Liver Disease 3, 693-716, 1999; J. Bukh y col., Semin. Liv. Dis. 15, 41-63, 1995). Lamentablemente, las infecciones de tipo 1 son más resistentes a la terapia que los genotipos del tipo 2 ó 3 (N.N. Zein, Clin. Microbiol. Rev. 13, 223-235, 2000).

30 Las proteínas estructurales virales incluyen una proteína de núcleo de nucleocápside (C) y dos glucoproteínas de envoltura, la E1 y la E2. El HCV codifica también a dos proteasas, una metaloproteínasa dependiente de cinc codificada por la región NS2-NS3 y una serina-proteasa codificada por la región NS3. Estas proteasas son necesarias para la rotura de las regiones específicas de la poliproteína previa de síntesis de los péptidos maduros. La mitad
35 carboxilo de la proteína 5 no estructural, la NS5B, contiene la polimerasa de RNA dependiente de RNA. La función de las demás proteínas no estructurales, la NS4A y la NS4B y la de la NS5A (la mitad amino-terminal de la proteína no estructural 5) continúa siendo desconocida. Se cree que la mayoría de las proteínas no estructurales codificadas por el genoma de RNA del HCV intervienen en la replicación del RNA.

Actualmente se dispone de un número limitado de terapias aprobadas para el tratamiento de la infección del HCV.
40 Se han revisado las estrategias terapéuticas nuevas y ya conocidas para tratar el HCV y para la inhibición de polimerasa NS5B del HCV: R.G. Gish, Sem. Liver Dis. 19, 5, 1999; Di Besceglie, A.M. y Bacon, B.R., Scientific American, octubre de 1999, 80-85; G. Lake-Bakaar, Current and Future Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Liver Disease, Curr. Drug Targ. Infect Dis. 3(3), 247-253, 2003; P. Hoffmann y col., Recent patent on experimental therapy for hepatitis C virus infection (1999-2002), Exp. Opin. Ther. Patents 13(11), 1707-1723, 2003; M.P. Walker y col.,
45 Promising Candidates for the treatment of chronic hepatitis C, Exp. Opin. Investing. Drugs 12(8), 1269-1280, 2003; S.-L. Tan y col., Hepatitis C Therapeutics: Current Status and Emerging Strategies, Nature Rev. Drug Discov. 1, 867-881, 2002; J.Z. Wu y Z. Hong, Targeting NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase for Anti-HCV Chemotherapy, Curr. Drug Targ. - Infect. Dis. 3(3), 207-219, 2003.

50 La ribavirina (amida del ácido 1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico; Virazole[®]) es un análogo de nucleósido sintético antivírico de amplio espectro, que no induce al interferón. La ribavirina tiene actividad "in vitro" contra diversos virus de DNA y RNA incluidos los *Flaviviridae* (Gary L. Davis, Gastroenterology 118, S104-S114, 2000). Aunque en la monoterapia, la ribavirina reduce los niveles normales de aminotransferasa en suero en el 40% de los pacientes, pero no reduce los niveles de HCV-RNA en
55 suero. La ribavirina presenta además una toxicidad significativa y se sabe que induce la anemia. La viramidina es un profármaco que, por acción de la adenosina-desaminasa, se convierte en la ribavirina en los hepatocitos (ver J.Z. Wu, Antivir. Chem. Chemother. 17(1), 33-9, 2006).

60 Durante casi una década se ha recurrido a los interferones (IFN) para el tratamiento de la hepatitis crónica. Los IFN son glucoproteínas producidas por las células inmunes en respuesta a una infección viral. Se han reconocido dos tipos diferentes de interferones: el tipo 1 influye a varios interferones alfa y un interferón beta; el tipo 2 incluye al interferón gamma. Los interferones del tipo 1 se producen principalmente en células infectadas y protegen las células vecinas de la infección "de novo". Los IFN inhiben la replicación vírica de muchos virus, incluido el HCV y, si se emplea como tratamiento único de la infección de la hepatitis C, el IFN suprime el HCV-RNA del suero hasta
65 niveles indetectables. Además, el IFN normaliza los niveles de aminotransferasa en suero. Lamentablemente, los

efectos del IFN son transitorios. Cuando se interrumpe la terapia se observa un índice de recaída del 70% y únicamente un 10-15% presenta una respuesta virológica sostenida, con niveles normales de alanina-transferasa en suero (Davis, Luke-Bakaar, lugar citado).

5 Una limitación de la primera terapia de IFN era la rápida desaparición de la proteína de la sangre. La derivatización química del IFN con polietilenglicol (PEG) ha dado lugar a proteínas de propiedades farmacocinéticas sustancialmente mejoradas. El PEGASYS® es un conjugado de interferón α -2a y con un PEG mono-metoxi ramificado de 40 kD y el PEG-INTRON® es un conjugado de interferón α -2b con un monometoxi-PEG de 12 kD (B.A. Luxon y col., Clin. Therap. 24(9), 1363-1383, 2002; A. Kozlowski y J.M. Harris, J. Control. Release 72, 217-224, 2001).

10 La terapia de combinación del HCV basada en la ribavirina y el interferón α es la terapia óptima actual para el HCV. Combinando la ribavirina con el PEG-IFN (ver más abajo) se obtiene una respuesta vírica persistente en un 54-56% de los pacientes con el tipo 1 del HCV. El SVR se aproxima al 80% para los tipos 2 y 3 del HCV (Walker, lugar citado). Lamentablemente, la terapia de combinación produce también efectos secundarios, que plantean retos clínicos. La depresión, los síntomas de tipo gripal y las reacciones cutáneas se han asociado con la administración subcutánea del IFN- α y la anemia hemolítica se ha asociado con el tratamiento sostenido con ribavirina.

15 Ahora se ha identificado un gran número de dianas moleculares potenciales para el desarrollo de fármacos que como terapias anti-HCV que incluyen, pero no se limitan a: la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa NS3, la helicasa NS3 y la polimerasa NS5B. La polimerasa de RNA dependiente de RNA es absolutamente esencial para la replicación del genoma de RNA de hebra simple y sentido positivo. Esta enzima ha despertado un interés significativo entre los químicos médicos.

20 Los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables son también útiles para el tratamiento y la prevención de infecciones virales, en especial de la infección de la hepatitis C, y de enfermedades de hospedantes vivos, cuando se emplean en combinación entre sí y con otros agentes biológicamente activos, incluido, pero sin limitarse a él, el grupo formado por el interferón, un interferón pegilado, la ribavirina, los inhibidores de proteasa, los inhibidores de polimerasa, los compuestos pequeños que interfieren en el RNA, los compuestos antisentido, los análogos de nucleótidos, los análogos de nucleósidos, las inmunoglobulinas, los inmunomoduladores, los protectores hepáticos, los agentes antiinflamatorios, los antibióticos, los compuestos antivirales y antiinfecciosos. Tal terapia de combinación puede consistir además en aportar un compuesto de la invención, ya sea de modo concomitante, ya sea de modo sucesivo, con otros agentes o potenciadores medicinales, por ejemplo la ribavirina y compuestos afines, la amantadina y compuestos afines, los diversos interferones, por ejemplo el interferón alfa, interferón beta, interferón gamma y similares, así como las formas alternativas de interferones como son los interferones pegilados. Pueden administrarse adicionalmente combinaciones de ribavirina e interferón en forma de terapia de combinación adicional en la que se incluya por lo menos uno de los compuestos de la presente invención.

35 Otros interferones actualmente en desarrollo incluyen al albinterferon- α -2b (albuferon), el IFN-omega con los productos DUROS, LOCTERON™ y el interferon- α -2b XL. Tan pronto estos y otros interferones se lancen al mercado, ahora ya se anticipa su utilización en combinación con los compuestos de la presente invención.

40 Los inhibidores de la polimerasa del HCV son otra diana del descubrimiento farmacológico y los compuestos en desarrollo incluyen al R-1626, R-7128, IDX184/IDX102, PF-868554 (Pfizer), VCH-759 (ViroChem), GS-9190 (Gilead), A-837093 y A-848837 (Abbot), MK-3281 (Merck), GSK949614 y GSK625433 (Glaxo), ANA598 (Anadys), VBY 708 (ViroBay).

45 Los inhibidores de proteasa NS3 del HCV se han identificado también como potencialmente útiles para el tratamiento del HCV. Los inhibidores de proteasa que se hallan en fase de ensayos clínicos incluyen al VX-950 (Telaprevir, Vertex), SCH503034 (Brocprevir, Schering), TMC435350 (Tibotec/Medivir) y ITMN-191 (Intermune). Otros inhibidores de proteasa que se hallan en las fases iniciales del desarrollo incluyen al MK7009 (Merck), BMS-790052 (Bristol Myers Squibb), VBY-376 (Virobay), IDXSCA/IDXSCB (Idenix), BI12202 (Boehringer), VX-500 (Vertex), PHX1766 (Phenomix).

50 Otras dianas de la terapia anti-HCV que se hallan en investigación incluyen los inhibidores de la ciclofilina que inhiben la fijación del RNA sobre el NS5b, nitazoxanida, celgosivir (Migenix), un inhibidor de la α -glucosidasa-1, los inhibidores de caspasa, los agonistas de receptores de tipo Toll y los inmunoestimulantes como la zadaxina (SciClone).

60 Actualmente no hay tratamiento preventivo contra el virus de la hepatitis C (HCV) y las terapias actualmente existentes, que van dirigidas solamente contra el HCV, son limitadas. Es esencial el diseño y el desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos.

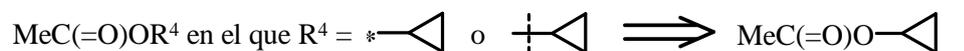
El término “un” o “una” entidad utilizada en esta descripción indica una o varias entidades; por ejemplo, un compuesto significa uno o varios compuestos y por lo menos un compuesto. En este sentido, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “por lo menos uno” pueden utilizarse indistintamente.

- 5 La frase “tienen los significados definidos anteriormente” se refiere a la definición más amplia de cada grupo establecida en el resumen de la invención o en la reivindicación más amplia. En las demás formas de ejecución mencionadas a continuación, los sustituyentes, que pueden estar presentes en cada forma de ejecución y que no se definan explícitamente, conservarán la definición más amplia establecida en el resumen de la invención.
- 10 Tal como se emplean en esta descripción, ya sea en una frase provisional, ya sea en el cuerpo de la reivindicación, los términos “comprende(n)” y “comprender” deben interpretarse en el sentido más amplio. Es decir, los términos tienen que interpretarse como sinónimos de “tienen por lo menos” o “incluyen por lo menos”. Cuando se emplea en el contexto de un proceso, el término “comprender” significa que el proceso incluye por lo menos los pasos aludidos, pero puede incluir otros pasos adicionales. Si se emplea en el contexto de un compuesto o composición, el término
- 15 “comprender” significa que el compuesto o composición incluye por lo menos las características o componentes mencionados, pero puede tener otras características o componentes adicionales.

El término “con independencia” se emplea aquí para indicar que una variable se aplica en cualquier caso sin tener en cuenta la presencia o ausencia de una variable que tenga la misma definición u otra definición distinta dentro del mismo compuesto. Por consiguiente, en un compuesto en el que R” aparezca dos veces y se defina como “con independencia carbono o nitrógeno”, entonces ambos R” pueden ser carbono, ambos R” pueden ser nitrógeno o un R” puede ser carbono y el otro nitrógeno.

Si una variable cualquiera (p.ej., R¹, R^{4a}, Ar, X¹ o Het) aparece más de una vez en un componente o en cualquier fórmula que describa o represente a los compuestos empleados o reivindicados en la presente invención, su definición en cada aparición es independiente de su definición en el resto de apariciones. Además son permisibles las combinaciones de sustituyentes y/o variables solamente en el caso que den lugar a compuestos estables.

Los símbolos “*” en el extremo de un enlace o “-----” trazados a través de un enlace indican en cada caso el punto de unión de un grupo funcional o otro resto químico al resto de la molécula, de la que forma parte. Por ejemplo:



Un enlace trazado hacia el interior de un sistema cíclico (a diferencia del conectado a un vértice concreto) indica que el enlace puede unirse a cualquiera de los átomos adecuados de dicho anillo.

35 Los términos “opcional” u “opcionalmente” aquí empleados indican que el acontecimiento o circunstancia que se menciona a continuación puede ocurrir, pero no de forma forzosa y que la definición incluye los casos en los que el acontecimiento o circunstancia suceden y los casos en los que no sucede. Por ejemplo “opcionalmente sustituido” indica que el resto opcionalmente sustituido puede incorporar un hidrógeno o un sustituyente.

40 El término “aproximadamente” aquí empleado indica en la región de, a grandes rasgos, o bien en torno a. Cuando se emplea el término “aproximadamente” en combinación con un intervalo numérico, entonces modifica este intervalo extendiendo los límites superior e inferior del intervalo numérico determinado. En general, el término “aproximadamente” se emplea para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido con una varianza del 20 %.

45 Tal como se emplea aquí, la enumeración de un intervalo numérico de una variable se realiza para indicar que la invención puede llevarse a la práctica cuando dicha variable adopta uno cualquiera de los valores comprendidos dentro de dicho intervalo. Por ejemplo, una variable que sea intrínsecamente discreta puede ser igual a cualquier valor entero del intervalo numérico, incluidos los valores inicial y final de dicho intervalo. De modo similar, si una variable es intrínsecamente continua, dicha variable puede adoptar cualquier valor real del intervalo numérico, incluidos los valores inicial y final del intervalo. Por ejemplo, una variable que se describe diciendo que tiene valores comprendidos entre 0 y 2, podrá ser 0, 1 ó 2 cuando dicha variable sea intrínsecamente discreta y podrá ser 0,0, 0,1, 0,01, 0,001 o cualquier valor real cuando dicha variable sea intrínsecamente continua.

55 Los compuestos del presente invento presentan tautomería. Los compuestos tautómeros pueden existir en forma de dos o más especies interconvertibles. Los tautómeros prototrópicos resultan de la migración de un átomo de hidrógeno unido mediante enlace covalente entre dos átomos. Los tautómeros existen normalmente en equilibrio y los intentos de aislar tautómeros individuales habitualmente dan lugar a una mezcla, cuyas propiedades físicas y químicas son consistentes con una mezcla de compuestos. La posición de equilibrio depende de las propiedades químicas de la molécula. Por ejemplo, en muchos aldehídos y cetonas alifáticos, tales como el acetaldehído, predomina la forma ceto; mientras que en los fenoles predomina la forma enol. Los tautómeros prototrópicos habituales incluyen a los tautómeros ceto/enol (-C(=O)-CH- ↔ -C(-OH)=CH-), amida/ácido imídico (-C(=O)-NH- ↔ -C(-

OH)=N-) y amidina (-C(=NR)-NH- ↔ -C(-NHR)=N-). Los dos últimos son particularmente frecuentes en los anillos heteroarilo y heterocíclico y la presente invención abarca todas las formas tautómeras de los compuestos.

Los compuestos del presente invento pueden contener un centro básico o ácido y las sales apropiadas se formarán con ácidos o bases que permitan formar sales no tóxicas que tengan una actividad antiviral similar. Los ejemplos de sales de ácidos inorgánicos incluyen el clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato. Los ejemplos de sales de ácidos orgánicos incluyen a las sales acetato, fumarato, pamoato, aspartato, besilato, carbonato, bicarbonato, camsilato, D- y L-lactato, D- y L-tartrato, esilato, mesilato, malonato, orotato, gluceptato, metilsulfato, estearato, glucuronato, 2-napsilato, tosilato, hibenzato, nicotinato, isetionato, malato, maleato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, esilato y pamoato. Véase una revisión de las sales idóneas en Berge y col., en J. Pharm. Sci. 66, 1-19, 1977 y G.S. Paulekuhn y col., J. Med. Chem. 50, 6665, 2007.

Los términos científicos y técnicos que se emplean aquí tienen los significados habitualmente aceptados entre los expertos en química orgánica, ámbito al que pertenece la presente invención, a menos que se indique otra cosa. Se remite a varias metodologías y materiales, ya conocidos por los expertos. Los manuales estándar que describen los principios generales de la farmacología incluyen el Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2001). Los materiales de partida y los reactivos empleados para obtener estos compuestos son por lo general productos comerciales, suministrados por proveedores tales como Aldrich Chemical Co. o pueden obtenerse por métodos ya conocidos de los expertos en la materia aplicando procedimientos descritos en manuales de referencia. Los materiales, reactivos y similares que se indican en la siguiente descripción y en los ejemplos pueden adquirirse a proveedores comerciales, a menos que se indique otra cosa. Los procedimientos sintéticos generales se describen en tratados tales como el Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: Nueva York, volúmenes 1-21; R.C. LaRock, Comprehensive Organic Transformations, 2^a edición, Wiley-VCH, Nueva York 1999; Comprehensive Organic Synthesis, B. Trost e I. Fleming (coordinadores), vol. 1-9, Pergamon, Oxford, 1991; Comprehensive Heterocyclic Chemistry, A.R. Katritzky y C.W. Rees (coord.), Pergamon, Oxford 1984, vol. 1-9; Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, A.R. Katritzky y C.W. Rees (coord.), Pergamon, Oxford 1996, vol. 1-11; y Organic Reactions, Wiley & Sons: Nueva York, 1991, volúmenes 1-40, que son manuales que resultarán familiares a los expertos.

En otra forma de ejecución de la presente invención se proporciona una composición que contiene un compuesto de la fórmula I, en la que R¹, R², R³, R⁴, R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R⁵, R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g y n tienen los significados definidos anteriormente, con por lo menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "alquilo" se emplea aquí sin más limitación, solo o en combinación con otros grupos, para indicar un resto hidrocarburo saturado, monovalente, de cadena lineal o ramificada, que contiene de 1 a 10 átomos de carbono. Tal como se emplea aquí, "alquilo C₁₋₆" indica un resto alquilo formado por 1 - 6 carbonos. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, pero no se limitan a: metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, neopentilo, hexilo y octilo. Cualquier enlace carbono-hidrógeno puede reemplazarse por un enlace carbono-deuterio sin apartarse del alcance de la invención.

Las definiciones aquí descritas pueden tener prefijos o sufijos para formar combinaciones químicamente importantes, por ejemplo "heteroalquilarilo", "haloalquilheteroarilo", "arilalquilheterociclilo", "alquilcarbonilo", "alcoxialquilo" y similares. Cuando el término "alquilo" se emplea como sufijo después de otro término, por ejemplo en "fenilalquilo" o ("arilalquilo") o "hidroxialquilo", esto indica que un resto alquilo, ya definido antes, está sustituido por uno o dos sustituyentes elegidos entre el otro grupo que se menciona específicamente. Así, por ejemplo, "fenilalquilo" indica un resto alquilo que tiene uno o dos sustituyentes fenilo e incluye, por tanto, al bencilo, feniletilo y bifenilo. Un "alquilaminoalquilo" es un grupo alquilo que tiene uno o dos sustituyentes alquilamino. "Hidroxialquilo" incluye al 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 1-(hidroximetil)-2-metil-propilo, 2-hidroxibutilo, 2,3-dihidroxibutilo, 2-(hidroximetilo), 3-hidroxipropilo, etcétera. Por consiguiente, tal como se emplea aquí, el término "hidroxialquilo" indica un subgrupo de restos heteroalquilo, definido a continuación. El término "(ar)alquilo" indica un resto alquilo sin sustituir o un aralquilo. El término "(hetero)arilo" indica un resto arilo o un resto heteroarilo.

Tal como se emplea aquí, el término "alquileno" indica un resto hidrocarburo saturado divalente lineal, de 1 a 10 átomos de carbono (p.ej., (CH₂)_n) o un resto hidrocarburo saturado divalente ramificado, de 2 a 10 átomos de carbono (p. ej., -CHMe- o -CH₂CH(i-Pr)CH₂-), a menos que se indique otra cosa. "Alquileno C₀₋₄" indica un resto hidrocarburo saturado divalente, lineal o ramificado que contiene 1-4 átomos de carbono o, en el caso C₀, indica que se omite el alquileno. Excepto que en el caso del metileno, las valencias abiertas de un resto alquileno no estarán unidas al mismo átomo. Los ejemplos de restos alquileno incluyen, pero no se limitan a: metileno, etileno, propileno, 2-metil-propileno, 1,1-dimetil-etileno, butileno, 2-etilbutileno.

El término "alcoxi" se emplea aquí para indicar un grupo -O-alquilo, en el que alquilo tiene el significado definido anteriormente, por ejemplo metoxi, etoxi, n-propiloxi, i-propiloxi, n-butiloxi, i-butiloxi, t-butiloxi, pentiloxi, hexiloxi, incluidos sus isómeros. Tal como se emplea aquí, "alcoxi inferior" indica un resto -O-alquilo, en el que alquilo es "alquilo inferior" ya definido anteriormente. Tal como se emplea aquí, "alcoxi C₁₋₁₀" indica un resto -O-alquilo, en el que alquilo es alquilo C₁₋₁₀.

- 5 El término "haloalquilo" se emplea aquí para indicar un resto alquilo de cadena lineal o ramificada, ya definido, en el que 1, 2, 3 o más átomos de hidrógeno se sustituyen por un halógeno. Los ejemplos son 1-fluormetilo, 1-clorometilo, 1-bromometilo, 1-yodometilo, difluormetilo, trifluormetilo, triclorometilo, 1-fluoretilo, 1-cloroetilo, 2-fluoretilo, 2-cloroetilo, 2,2-dicloroetilo, 3-bromopropilo o 2,2,2-tri-fluoretilo. El término "fluoralquilo" se emplea aquí para indicar un resto haloalquilo, en el que el halógeno es el flúor.
- 10 El término "acilo" (o "alcanoilo") se emplea aquí para indicar a grupo de fórmula $-C(=O)R$, en la que R es hidrógeno o alquilo inferior, ya definido antes. El término "alquilcarbonilo" se emplea aquí para indicar a grupo de fórmula $C(=O)R$ en la que R es alquilo ya definido antes. El término acilo o alcanoilo C_{1-6} indica un resto $-C(=O)R$ que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. El grupo acilo C_1 es el resto formilo, en el que $R = H$ y un resto acilo C_6 indica un resto hexanoilo, si la cadena alquilo es lineal. El término "arilcarbonilo" o "aroilo" se emplea para indicar un resto de la fórmula $C(=O)R$, en la que R es un resto arilo; el término "benzoilo" se emplea para indicar un resto "arilcarbonilo" o "aroilo" en el que R es fenilo.
- 15 Los términos "alquilsulfonilo" y "arilsulfonilo" se emplean aquí para indicar a grupo de fórmula $-S(=O)_2R$, en la que R es alquilo y arilo, respectivamente y alquilo y arilo tienen los significados ya definidos. El término (alquil C_{1-3})sulfonilamido se emplea para indicar un resto RSO_2NH- , en el que R es un resto alquilo C_{1-3} ya definido antes. Los términos halo(alquil C_{1-6})-sulfonilo, (cicloalquil C_{3-7})-sulfonilo, (cicloalquilo C_{3-7})-(alquil C_{1-3})-sulfonilo o (alcoxi C_{1-6})-(alquil C_{1-6})-sulfonilo indican un compuesto $S(=O)_2R$ en el que R es haloalquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , (cicloalquil C_{3-7})-alquilo C_{1-3} y (alcoxi C_{1-6})-alquilo C_{1-6} , respectivamente.
- 20 Los términos "alquilsulfonilamido" y "arilsulfonilamido" se emplean aquí para indicar restos de la fórmula $-NR'S(=O)_2R$, en la que R es alquilo y arilo, respectivamente, R' es hidrógeno o alquilo C_{1-3} y alquilo y arilo tienen los significados aquí definidos. El término "sulfonilamino" puede emplearse como prefijo, mientras que "sulfonilamida" es el correspondiente sufijo.
- 25 El término "cicloalquilo" se emplea aquí para indicar un anillo carbocíclico saturado, que contiene de 3 a 8 átomos de carbono, es decir, el ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. "Cicloalquilo C_{3-7} " se emplea aquí para indicar un cicloalquilo que contiene de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo carbocíclico.
- 30 El término "cicloalquilalquilo" se emplea aquí para indicar el resto R'R"-, en el que R' es un resto cicloalquilo aquí definido y R" es un resto alquileno aquí definido, dando por supuesto que el punto de unión del resto cicloalquilalquilo estará situado sobre el resto alquileno. Los ejemplos de restos cicloalquilalquilo incluyen, pero no se limitan a: ciclopropilmetilo, ciclohexilmetilo, ciclopentiletilo. "(Cicloalquil C_{3-7})-alquilo C_{1-3} " indica un resto R'R", en el que R' es cicloalquilo C_{3-7} y R" es alquileno C_{1-3} , aquí definidos.
- 35 El término "halógeno" o "halo" se emplea aquí para indicar el flúor, cloro, bromo o yodo.
- 40 Los términos "hidroxialquilo" o "alcoxialquilo" se emplean aquí para indicar un resto alquilo, ya definido antes, en el que de uno a tres átomos de hidrógeno de diferentes átomos de carbono se ha/han reemplazado por grupos hidroxilo y alcoxi, respectivamente. Un resto (alcoxi C_{1-3})-alquilo C_{1-6} indica un resto alquilo C_{1-6} en el que de 1 a 3 átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos alcoxi C_{1-3} y el punto de unión del alcoxi está en el átomo de oxígeno.
- 45 Los términos "alcoxicarbonilo" y "ariloxicarbonilo" se emplean para indicar un resto de la fórmula $-C(=O)OR$, en la que R es alquilo y arilo, respectivamente, y alquilo y arilo tienen los significados ya definidos.
- 50 El término "ciano" se emplea aquí para indicar un carbono unido a un nitrógeno mediante un triple enlace, es decir, el $-C\equiv N$. El término "nitro" se emplea aquí para indicar un resto $-NO_2$. El término "carboxi" se emplea aquí para indicar un resto $-CO_2H$.
- El término "oxo" indica un oxígeno unido mediante un doble enlace ($=O$), es decir, un grupo carbonilo.
- 55 El término "acilo" (o "alcanoilo") como aquí se utiliza denota un grupo de la fórmula $-C(=O)R$ en donde R es hidrógeno o alquilo inferior como aquí se define. El término o "alquilcarbonilo" como aquí se utiliza denota un grupo de la fórmula $C(=O)R$ en donde R es alquilo como aquí se define. El término acilo C_{1-6} o "alcanoilo" se refiere a un grupo $-C(=O)R$ que contiene 1 a 6 átomos de carbono. El grupo acilo C_1 es el grupo formilo en donde $R = H$ y un grupo acilo C_6 se refiere a hexanoilo en donde la cadena alquilo no está ramificada. El término "arilcarbonilo" o "aroilo" como aquí se utiliza significa un grupo de fórmula $C(=O)R$ en donde R es un grupo arilo; el término "benzoilo" como aquí se utiliza es un grupo "arilcarbonilo" o "aroilo, en donde R es
- 60 El término "heteroarilo" si se emplea sin definición ni limitación adicional indica anillos "piridinilo", "pirazinilo" y "piridazinilo". El término "piridina" ("piridinilo") indica un anillo heteroaromático de seis eslabones, que contiene un átomo de nitrógeno. Los términos "pirimidina" ("pirimidinilo"), "pirazina" ("pirazinilo") y "piridazina" ("piridazinilo") indican un anillo heteroaromático no fusionado de seis eslabones, que contiene dos átomos de nitrógeno dispuestos
- 65

en las posiciones 1,3, 1,4 y 1,2, respectivamente. Los nombres de los restos correspondientes se indican entre paréntesis.

5 El término "sulfamoilo" se emplea aquí para indicar el resto $-S(O)_2NH_2$. Los términos "N-alquilsulfamoilo" y "N,N-dialquilsulfamoilo" se emplean para indicar el resto $-S(O)_2NR'R''$, en el que R' y R'' son hidrógeno y alquilo inferior y R' y R'' son con independencia alquilo inferior, respectivamente. Los ejemplos de restos N-alquilsulfamoilo incluyen, pero no se limitan a: metilaminosulfonilo, isopropilaminosulfonilo. Los ejemplos de restos N,N-dialquilsulfamoilo incluyen, pero no se limitan a: dimetilaminosulfonilo, isopropil-metilaminosulfonilo.

10 El término "carbamoilo" se emplea para indicar el resto $-CONH_2$. El prefijo "N-alquilcarbamoilo" y "N,N-dialquilcarbamoilo" indica un resto $CONHR'$ y $CONR'R''$, respectivamente, en los que R' y R'' son con independencia restos alquilo ya definidos antes. El prefijo "N-arilcarbamoilo" indica un resto $CONHR'$ en el que R' es un resto arilo, ya definido antes.

15 Los términos "alquilsulfonilo" y "arilsulfonilo" se emplean aquí para indicar a grupo de fórmula $-S(=O)R$, en la que R es alquilo y arilo, respectivamente y alquilo y arilo tienen los significados ya definidos.

20 Los términos "alquilsulfonilo" y "arilsulfonilo" se emplean aquí para indicar a grupo de fórmula $-S(=O)_2R$, en la que R es alquilo y arilo, respectivamente y alquilo y arilo tienen los significados ya definidos.

25 El término "bencilo" se emplea para indicar un resto $C_6H_5CH_2$ en el que el anillo fenilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más, con preferencia de uno a tres sustituyentes elegidos con independencia entre hidroxilo, tio, ciano, alquilo, alcoxi, haloalcoxi inferior, alquiltio, halógeno, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, dialquilamino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino, a menos que se indique otra cosa.

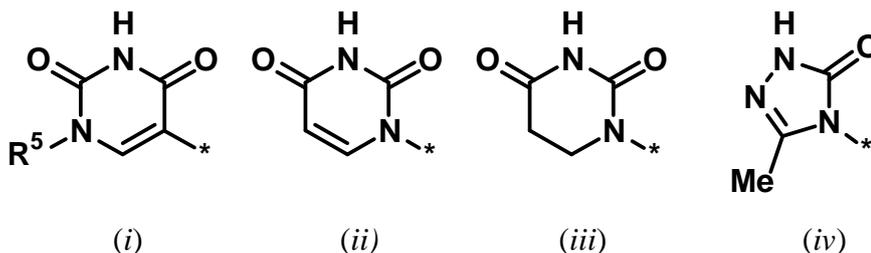
30 El término "heteroarilo" como aquí se utiliza sin definición o limitación adicional se refiere a anillos "piridinilo", "piracino" y "piridacino". El término ("piridinilo") se refiere a un anillo heteroaromático de seis miembros con un átomo de nitrógeno. Los términos "pirimidina" (pirimidinilo), "piracina" ("piracino") y "piridacina" (piridacino) se refiere a un anillo heteroaromático no fusionado con dos átomos de nitrógeno dispuestos en una relación 1,3, 1,4 y 1,2 respectivamente. Los nombres del radical respectivo están entre paréntesis.

35 Los términos "oxetano" (oxetanilo), "tetrahidrofurano" (tetrahidrofuranilo) y "tetrahidropirano" (tetrahidropiranilo) indican anillos heterocíclicos no fusionados de cuatro, cinco y seis miembros, respectivamente, cada uno de los cuales contiene un átomo de oxígeno.

El término "arilo" se emplea aquí para indicar el fenilo.

40 El término "amina cíclica" indica un anillo carbonado saturado, que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, ya definido antes, en el que por lo menos uno de los átomos de carbono se ha reemplazado por un heteroátomo elegido entre el grupo formado por N, O y S, por ejemplo, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, di-oxo-tiomorfolina, pirrolidina, pirazolina, imidazolidina, azetidina, en las que los átomos de carbono de los anillos están opcionalmente sustituidos por uno o más restos, elegidos entre el grupo formado por halógeno, hidroxilo, fenilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, o 2 átomos de hidrógeno de un mismo átomo de carbono se han reemplazado por oxo ($=O$). Si la amina cíclica es una piperazina, un átomo de nitrógeno puede sustituirse opcionalmente por un alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} .

50 Los términos (i) 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidin-5-ilo (si R^5 es H), (ii) 2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-ilo, (iii) 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidro-2H-pirimidin-1-ilo o (iv) 3-metil-5-oxo-1,5-dihidro-[1,2,4]-triazol-4-ilo indican los restos siguientes:



55 3-oxo-3,4-dihidro-pirazin-2-ilo, (ii) 3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-ilo, (iii) 2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-ona-5-ilo, (iv) 2-oxo-1,2-dihidro-piridin-3-ilo, (v) 6-oxo-1,6-dihidro-[1,2,4]triazin-5-ilo y (vi).

Las abreviaturas empleadas habitualmente incluyen: acetilo (Ac), acuoso (aq.), atmósferas (atm), 2,2'-bis(di-fenilfosfino)-1,1'-binaftilo (BINAP), tert-butoxicarbonilo (Boc), pirocarbonato de di-tert-butilo o anhídrido boc (BOC₂O), bencilo (Bn), butilo (Bu), número de registro según Chemical Abstracts (CASRN), benciloxicarbonilo (CBZ o Z), carbonil-diimidazol (CDI), 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), N,N'-dodiclohexilcarbodiimida (DCC), 1,2-dicloroetano (DCE), diclorometano (DCM), azodicarboxilato de dietilo (DEAD), azodicarboxilato de di-iso-propilo (DIAD), hidruro de di-iso-butyl-aluminio (DIBAL o DIBAL-H), di-iso-propiletilamina (DIPEA), N,N-dimetil-acetamida (DMA), 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), N,N-dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), clorhidrato de la 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), etilo (Et), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), 2-etoxi-2H-quinolina-1-carboxilato de etilo (EEDQ), éter de dietilo (Et₂O), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), ácido acético (HOAc), 1-N-hidroxibenzotriazol (HOBt), cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), isopropanol (IPA), metanol (MeOH), punto de fusión (p.f.), MeSO₂- (mesilo o Ms), metilo (Me), acetonitrilo (MeCN), ácido m-cloroperbenzoico (MCPBA), espectro de masas (EM), éter de metilo y tert-butilo (MTBE), N-metilmorfolina (NMM), N-metilpirrolidona (NMP), fenilo (Ph), propilo (Pr), isopropilo (i-Pr), libras por pulgada cuadrada (psi), piridina (pir), temperatura ambiente (t.amb. o t.amb.), satd. (saturado), tert-butildimetilsililo o t-BuMe₂Si (TBDMS), trietilamina (TEA o Et₃N), triflato o CF₃SO₂- (Tf), ácido trifluoracético (TFA), tetrafluorborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), cromatografía de capa fina (CCF), tetrahidrofurano (THF), tetrametiletlenodiamina (TMEDA), trimetilsililo o Me₃Si (TMS), ácido p-toluenosulfónico monohidratado (TsOH o pTsOH), 4-Me-C₆H₄SO₂- o tosilo (Ts), N-uretano-N-carboxianhídrido (UNCA). La nomenclatura convencional, incluidos los prefijos normal (n), iso (i-), secundario (sec-), terciario (tert-) y neo tiene los significados habituales cuando se aplica a los restos alquilo (J. Rigaudy y D.P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979, Pergamon Press, Oxford).

Los compuestos del presente invento se proporcionan en la Tabla siguiente.

25

Tabla I

| comp. del ej. | estructura | IC ₅₀ (μmoles) ¹ | p.f. | EM |
|---------------|------------|--|-------------|-----|
| 1 | | 0,0006 | | 478 |
| 2 | | 0,0004 | | 492 |
| 3 | | 0,0002 | 275,0-278,0 | 495 |

1. Ensayo de la polimerasa del HCV (ejemplo 5)

30

35

La actividad de los compuestos de la invención como inhibidores de la actividad del HCV puede determinarse por cualquier método apropiado, ya conocido de los expertos, incluidos los ensayos "in vivo" e "in vitro". Por ejemplo, la actividad inhibidora de la NS5B del HCV de los compuestos de la fórmula I puede determinarse con procedimientos estándar de ensayo, descritos en Behrens y col., EMBO J. 15, 12-22, 1996, Lohmann y col., Virology 249, 108-118, 1998 y Ranjith-Kumar y col., J. Virology 75, 8615-8623, 2001. A menos que se indique otra cosa, los compuestos de esta invención han demostrado actividad inhibidora de NS5b HCV "in vitro" en dichos ensayos estándar. Las condiciones de ensayo de la polimerasa del HCV aplicadas para los compuestos de la presente invención se describen en el ejemplo 8. Se han desarrollado sistemas de replicón de base celular para el HCV, en los que las proteínas no estructurales replican de modo estable el RNA vírico subgenómico en células Huh7 (V. Lohmann y col., Science 285, 110, 1999 y K.J. Blight y col., Science 290, 1972, 2000). Las condiciones de ensayo de replicón de base celular aplicadas a los compuestos de la presente invención se describen en el ejemplo 4. En ausencia de replicasa HCV funcional purificada, formada por proteínas víricas no estructurales y proteínas de hospedante, nuestros conocimientos de la síntesis de RNA de los *Flaviviridae* procede de estudio en los que se emplean RNA-

polimerasas dependientes de RNA recombinantes y activas y de la validación de estos estudios en el sistema de replicón de HCV. La inhibición de la polimerasa de HCV recombinante purificada con compuestos en ensayos bioquímicos "in vitro" puede validarse empleando el sistema de replicón, para ello la polimerasa existe en el complejo de replicasa, asociado con otros polipéptidos víricos y celulares, en una estequiometría apropiada. La demostración de la inhibición de base celular de la replicación del HCV puede ser más predictiva de la función "in vivo" que la demostración de la actividad inhibitoria de la NS5B del HCV en ensayos bioquímicos "in vitro".

Los compuestos de la presente invención pueden formularse en una amplia variedad de formas y vehículos de dosificación para la administración oral. La administración oral puede realizarse en forma de tabletas, tabletas recubiertas, grageas, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones, emulsiones, jarabes o suspensiones. Los compuestos de la presente invención son eficaces cuando se administran por otras vías de administración, incluidas la continua (goteo intravenoso), tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente mejorador de penetración), bucal, nasal, inhalación y supositorios, entre otras vías de administración. El modo preferido de administración es en general el oral, aplicando un régimen conveniente de dosificación diaria, que puede ajustarse al grado de severidad y a la respuesta del paciente al principio activo.

Un compuesto o compuestos de la presente invención, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con uno o varios excipientes, vehículos o diluyentes convencionales, puede envasarse dentro de una forma de composición farmacéutica y dosificación unitaria. Las composiciones farmacéuticas y las formas unitarias de dosificación pueden contener ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales y las formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz del ingrediente activo, acorde con el intervalo de dosificación diaria que se pretenda emplear. Las composiciones farmacéuticas pueden emplearse en forma de sólidos, por ejemplo tabletas o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación persistente o líquidos, por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes o cápsulas rellenas para el uso oral; o en forma de supositorios para la administración rectal o vaginal; o en forma de soluciones inyectables estériles para el uso parenteral. Una preparación típica contendrá del 5 % al 95 % de compuesto o compuestos activos (p/p). El término "preparación" o "forma de dosificación" indica tanto formulaciones sólidas como líquidas del compuesto activo y los expertos en la materia sabrán entender que un ingrediente activo puede existir en diferentes preparaciones en función del órgano o tejido diana y de la dosis y de los parámetros farmacocinéticos deseados.

El término "excipiente" empleado en la descripción indica un compuesto que es útil para preparar una composición farmacéutica, es sano en general, no tóxico y no molesto en sentido biológico ni en ningún otro sentido e incluye a los excipientes que son aceptables para el uso veterinario y también para el uso farmacéutico en humanos. Los compuestos de esta invención pueden administrarse solos o bien, en general, se administrarán mezclados con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente idóneos, elegidos en función de la vía de administración deseada y de la práctica farmacéutica estándar.

"Farmacéuticamente aceptable" indica que es útil para la fabricación de una composición farmacéutica que es segura en general, no tóxica y no molesta en sentido biológico ni en ningún otro sentido e incluye que es aceptable para el uso farmacéutico humano.

Una forma de "sal farmacéuticamente aceptable" de un ingrediente activo puede conferir también inicialmente una propiedad farmacocinética deseable al principio activo, que estaría ausente en la forma de no sal y puede afectar a la farmacodinámica del principio activo en lo que respecta a su actividad en el cuerpo. La frase "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen: (1) las sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos, por ejemplo con ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido tert-butilacético, ácido lauril-sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) las sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original se reemplaza por un ion metálico, p.ej. un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica, por ejemplo con la etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

Las preparaciones en forma sólida incluyen los polvos, las tabletas, las píldoras, las cápsulas, los sellos, los supositorios y los gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o varias sustancias que actúan además como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes desintegrantes de tabletas o un material encapsulante. En los polvos, el vehículo se halla en general en forma de sólido finamente dividido, mezclado con el principio activo finamente dividido. En las tabletas, el principio activo se mezcla en general con el vehículo que tiene la capacidad aglutinante necesaria en proporciones

5 adecuadas y se compactan en forma y tamaño deseados. Los vehículos idóneos incluyen, pero no se limitan a: carbonato magnésico, estearato magnésico, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. Las formulaciones de forma sólida pueden contener, además del principio activo, colorantes, aromas, estabilizantes, tampones, edulcorantes naturales y artificiales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

Las formulaciones líquidas son también apropiadas para la administración oral e incluyen la formulación líquida que incluye a las emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas y suspensiones acuosas. Estas incluyen las preparaciones de forma sólida que se pretende convertir en preparaciones en forma líquida inmediatamente antes del uso.

10 Las emulsiones pueden prepararse también en soluciones, por ejemplo, en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitano o acacia. Las soluciones acuosas pueden prepararse disolviendo el principio activo en agua y añadiendo los colorantes, aromas, agentes estabilizantes y espesantes idóneos. Las suspensiones acuosas pueden prepararse dispersando el principio activo finamente dividido en agua con un material viscoso, por ejemplo las gomas naturales o sintéticas, las resinas, la metilcelulosa, la carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos.

20 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración parenteral (p.ej. por inyección, por ejemplo la inyección de bolo o la infusión continua) y pueden presentarse en formas unitarias de dosificación de tipo viales, jeringuillas prerrellenadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes multidosis a los que se añade un conservante. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, por ejemplo soluciones en polietilenglicol acuoso. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos aceitosos o no acuosos, incluyen al propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (p.ej. aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (p.ej. oleato de etilo) y pueden contener auxiliares de formulación, por ejemplo conservantes, humectantes, emulsionantes o agentes de suspensión, estabilizantes y/o agentes dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede adoptar la forma de polvo, obtenida por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de una solución para la constitución antes del uso con un vehículo idóneo, p.ej. agua estéril, libre de pirógenos.

30 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración tópica sobre la epidermis en forma de ungüentos, cremas, lociones o como parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa o aceitosa a la que se añaden los agentes espesantes y/o gelificantes idóneos. Las lociones pueden formularse con una base acuosa o aceitosa y contendrán además en general uno o varios agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las formulaciones idóneas para la administración tópica en la boca incluyen las píldoras que contienen los principios activos en una base aromatizada, normalmente sucrosa, acacia o tragacanto; las pastillas que contienen el ingrediente activo en una base inerte, por ejemplo gelatina y glicerina o sucrosa y acacia; los enjuagues bucales que contienen el principio activo en un vehículo líquido apropiado.

40 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración en forma de supositorios. En primer lugar se funde una cera de bajo punto de fusión, por ejemplo una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao y en ella se dispersa de forma homogénea el principio activo, por ejemplo por agitación. La mezcla fundida homogénea se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

45 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración vaginal. En la técnica ya se conocen como apropiados los pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que, además del principio activo, contienen tales vehículos. Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración nasal. Se aplican las soluciones o suspensiones directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un cuentagotas, una pipeta o un nebulizador. Las formulaciones pueden suministrarse en una forma de dosis única o de dosis múltiple. En el último caso de un cuentagotas o una pipeta, esto puede realizarse por el mismo paciente que se administre un volumen apropiado, predeterminado, de la solución o suspensión. En el caso de un nebulizador, esto puede lograrse por ejemplo mediante una bomba nebulizadora calibrada.

55 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración de aerosol, en particular al tracto respiratorio, incluida la administración intranasal. El compuesto tendrá en general un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo del orden de cinco (5) micras o menos. Este tamaño de partícula puede obtenerse por medios ya conocidos de la técnica, por ejemplo por micronización. El principio activo se aloja en un envase presurizado con un propelente idóneo, por ejemplo un hidrocarburo clorofluorado (CFC), por ejemplo el diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoretano o dióxido de carbono u otro gas apropiado. El aerosol puede contener además de modo conveniente un tensioactivo, por ejemplo la lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse mediante una válvula calibrada. Como alternativa, los principios activos pueden suministrarse en forma de polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del compuesto en una base pulverulenta idónea, por ejemplo lactosa, almidón, derivados de almidón, tales como la hidroxipropilmetil-celulosa y polivinilpirrolidona (PVP). El vehículo pulverulento formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en una forma unitaria de dosificación, por ejemplo en cápsulas o cartuchos, p.ej. de gelatina o en envases de tipo blister, a partir de los cuales se puede administrar el polvo mediante un inhalador.

Si se desea, las formulaciones pueden fabricarse con recubrimiento entérico, adaptado a una administración con liberación persistente o controlada del principio activo. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden formularse en dispositivos de entrega de fármaco transdérmica o subcutánea. Estos sistemas de entrega son ventajosos cuando es necesaria la liberación sostenida del compuesto y cuando la tolerancia del paciente es crucial para el régimen de tratamiento. Los compuestos de sistemas de entrega transdérmicos se alojan con frecuencia en un soporte sólido adherido sobre la piel. El compuesto de interés puede combinarse además con un mejorador de penetración, p.ej. la azona (1-dodecilaza-cicloheptan-2-ona). Los sistemas de entrega con liberación persistente se insertan subcutáneamente a la capa subdérmica mediante cirugía o inyección. Los implantes subdérmicos encapsulan el compuesto en una membrana soluble en lípidos, p.ej. caucho de silicona o un polímero biodegradable, p.ej. ácido poliláctico.

Las formulaciones idóneas junto con los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos se describen en el manual Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 1995, coordinado por E.W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pennsylvania. Un científico experto en formulaciones podrá modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la especificación para obtener numerosas formulaciones destinadas a una vía concreta de administración sin por ello inestabilizar las composiciones de la presente invención ni comprometer su actividad terapéutica.

La modificación de los compuestos presentes para hacerlos más solubles en agua o en otro vehículo, por ejemplo, puede llevarse fácilmente a la práctica mediante modificaciones menores (formación de sal, esterificación, etc.), que son bien conocidas de los expertos en la materia. Los expertos en la materia saben además modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto concreto con el fin de gestionar mejor la farmacocinética de los compuestos presentes para que tengan el efecto beneficioso máximo en los pacientes.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" empleado en la descripción significa la cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis deberá ajustarse a los factores individuales de cada caso particular. Tal dosis puede variar dentro de amplios límites, en función de numerosos factores, como son la severidad de la enfermedad a tratar, la edad y el estado general de salud del paciente, otros medicamentos que el paciente esté tomando, la vía y la forma de administración y las preferencias y la exigencia del facultativo que atiende al paciente. Para la administración oral puede ser apropiada una dosis diaria de 0,01 a 1000 mg/kg de peso corporal al día en régimen de monoterapia y/o de terapia de combinación. Una dosis diaria preferida se sitúa entre 0,1 y 500 mg/kg de peso corporal, especialmente entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal y muy especialmente preferida entre 1,0 y 10 mg/kg de peso corporal al día. Por lo tanto, para la administración a una persona de 70 kg, la dosis podría situarse entre 7 mg y 0,7 g al día. La dosificación diaria puede administrarse en una sola dosis o toma o dividirse en varias subdosis, por ejemplo entre 1 y 5 subdosis al día. En general, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas, inferiores a la dosis óptima del compuesto. A continuación se incrementa la dosis hasta alcanzar el efecto óptimo para el paciente individual. Los expertos en tratar enfermedades del tipo descrito aquí serán capaces, sin realizar experimentación innecesaria y en base a sus conocimientos y experiencia personal y considerando las enseñanzas de esta aplicación, de evaluar la cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad y paciente concretos.

En las formas de ejecución de la invención, el compuesto activo o una sal del mismo pueden administrarse en combinación con otros agentes antivirales, por ejemplo un inhibidor nucleósido de la polimerasa del HCV, otro inhibidor no nucleósido de la polimerasa del HCV o un inhibidor de proteasa del HCV. Cuando el compuesto activo o su derivado o su sal se administran en combinación con otro agente antiviral, la actividad puede incrementarse con respecto al compuesto original. Cuando el tratamiento es una terapia de combinación, la administración puede ser concurrente o sucesiva, en lo que respecta a los derivados nucleósidos. La "administración concurrente" indica una administración de los agentes al mismo tiempo o en diferentes tiempos. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo puede realizarse con una formulación única que contenga dos o más principios activos mediante una administración sustancialmente simultánea de dos o más formas de dosificación con un principio activo individual.

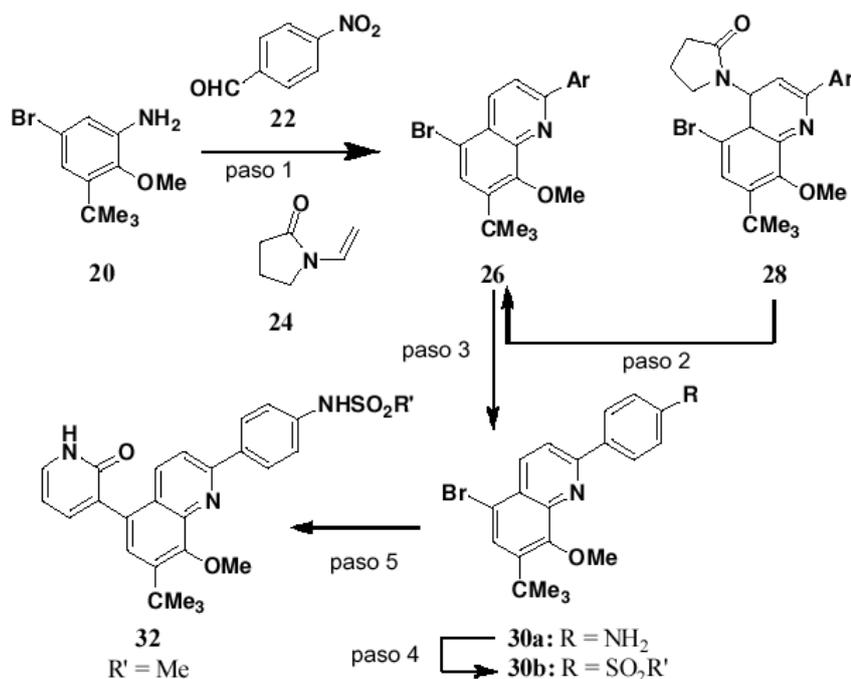
Se da por supuesto que las referencias presentes al tratamiento se extienden tanto a la profilaxis como al tratamiento de las condiciones actuales. Además, el término "tratamiento" de una infección del HCV, tal como se emplea aquí, incluye también el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o estado patológico asociado con o mediado por la infección del HCV o los síntomas clínicos de la misma.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como aquí se utiliza significa una cantidad requerida para reducir síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad que ha de tratarse, la edad y el estado de salud general del paciente, otros medicamentos con los que está siendo tratado el paciente, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del experto médico implicado. Para la administración oral deberá ser apropiada una dosis diaria de entre alrededor de 0,01 y alrededor de 1000 mg/kg de peso corporal en monoterapia y/o en terapia de combinación. Una dosis diaria preferida se encuentra entre alrededor de 0,1 y alrededor de 500 mg/kg de peso corporal, mas preferentemente entre 0,1 y alrededor de 100 mg/kg de peso corporal y mas prefernetmente entre 1,0 y alrededor de 10 mg/kg de peso corporal por día. Así pues, para administración a

una persona de 70 kg, la dosis deberá estar entre alrededor de 7 mg y 0,7 g por día. La dosis diaria puede administrarse como una sola dosis o en dosis individuales, típicamente entre 1 y 5 dosis por día. Generalmente el tratamiento se inicia con dosis menores que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Luego se aumenta la dosis según pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo para el paciente individual. Un experto ordinario en el tratamiento de enfermedades aquí descritas podrá, sin experimentación indebida y en confianza con el conocimiento personal, experiencia y las revelaciones de esta patente, determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos del presente invento para una enfermedad y paciente dados.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, y opcionalmente uno o más agentes antivíricos adicionales, es una cantidad eficaz para reducir la carga viral o para lograr una respuesta viral sostenida a la terapia. Los indicadores útiles de una respuesta sostenida, además de la carga vírica, incluyen, pero no se limitan a: la fibrosis hepática, la elevación de los niveles de transaminasa en suero y la actividad necroinflamatoria en el hígado. Un ejemplo habitual que se pretende que sea ilustrativo pero no limitante de un marcador es la alanina-transaminasa (ALT) en suero, que se mide mediante ensayos clínicos estándar. En algunas formas de ejecución de la invención, un régimen de tratamiento eficaz es aquel que reduce los niveles de la ALT a menos de 45 IU/ml de suero.

La modificación de los compuestos presentes para hacerlos más solubles en agua o en otros vehículos, por ejemplo, puede efectuarse fácilmente mediante cambios menores (formulación de la sal, esterificación, etc.), que los expertos conocen bien. Los expertos saben además perfectamente el modo de modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto concreto con el fin de gestionar la farmacocinética de los compuestos presentes y conseguir de ellos el efecto beneficioso máximo en los pacientes.



Ejemplos

Ejemplo 1

N-{4-[7-tert-butil-8-metoxi-5-(2-oxo-1,2-dihidro-piridin-3-il)-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida

Ref.: V.V. Kouznetsov y col., Molecular Diversity 10, 29 – 37, 2006.

Paso 1: Se agita a t.amb. durante 45 min una mezcla del compuesto 20 (2,0 g, 7,75 mmoles), el 22 (1,40 g, 11,62 mmoles) y el MeCN (10 ml). A esta mezcla se le añade el BiCl₃ (0,49 g, 1,55 mmoles) y por goteo una solución de la N-vinil-pirrolidinona (24, 1,72 g, 15,50 mmoles) en MeCN (10 ml). Se agita la mezcla resultante durante 16 h y se diluye con EtOAc y H₂O (aprox. 20 ml). Se filtra el sólido blanco y se lava con H₂O. Se seca la fase orgánica del líquido filtrado (MgSO₄), se filtra y se concentra. Se purifica el material en bruto por cromatografía a través de SiO₂ eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexano (del 15 al 75% de EtOAc), obteniéndose 312 mg del compuesto 26 y 978 mg del 28.

Paso 2: A una solución del aducto 28 (705 mg, 1,40 mmoles) en MeCN (10 ml) enfriada a 0°C se le añade por goteo una solución de CAN (1,92 g, 3,51 mmoles) en MeCN (10 ml). Se agita la mezcla reaccionante a 0°C hasta que se haya consumido todo el material de partida. Se diluye la mezcla reaccionante con EtOAc y H₂O. Se separa la fase orgánica, se lava con salmuera, se seca (MgSO₄), se filtra y se concentra. Se purifica el material en bruto por

5 cromatografía a través de SiO₂ eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexano (del 1 al 15% de EtOAc), obteniéndose 302 mg del compuesto 26 en forma de sólido ligeramente amarillo.

5 Paso 3: se calienta a reflujo durante 1,5 h una mezcla del compuesto 26 (300 mg, 0,72 mmoles), hierro en polvo (121 mg, 2,17 mmoles) y NH₄Cl (116 mg, 2,17 mmoles) en una mezcla de MeOH (30 ml) y H₂O (10 ml). Se enfría la mezcla reaccionante a t.amb. y se filtra a través de un lecho de CELITE. Se concentra el líquido filtrado y se reparte el residuo entre EtOAc y H₂O. Se seca la fase orgánica (MgSO₄), se filtra y se concentra con vacío, obteniéndose 202 mg del compuesto 30a, que se emplea sin más purificación.

10 Paso 4: A una solución del 30a (200 mg, 0,52 mmoles) en DCM (5 ml) enfriada a 0°C se le añaden la piridina (92 µl, 1,14 mmoles) y después el MsCl (42 µl, 0,55 mmoles). Se agita la mezcla reaccionante a 0°C durante 45 min, se trata con H₂O y se diluye con EtOAc. Se separa la fase orgánica, se lava con salmuera, se seca (MgSO₄), se filtra y se concentra. Se purifica el material en bruto por cromatografía a través de SiO₂ eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexano (del 20 al 70% de EtOAc), obteniéndose 208 mg del compuesto 30b.

15 Paso 5: Se sella un tubo, en el que se han introducido el 30b (50 mg, 0,11 mmoles), el ácido 2-hidroxi-piridin-3-il-borónico (18 mg, 0,16 mmoles), Pd(dppf)Cl₂(CH₂Cl₂) (4 mg, 0,01 mmoles) y Na₂CO₃ (17 mg, 0,16 mmoles), MeOH (3 ml) y DCM (1 ml) y se irradia en un reactor de microondas a 115°C durante 25 min. Se concentra la mezcla reaccionante y se purifica el producto en bruto por cromatografía a través de SiO₂ eluyendo con EtOAc, de este modo se obtienen 32 mg del compuesto 32 en forma de sólido.

Ejemplo 2

N-{4-[7-tert-butil-8-metoxi-5-(6-metil-2-oxo-1,2-di-hidro-piridin-3-il)-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida

25 Se obtiene la N-{4-[7-tert-butil-8-metoxi-5-(2-metoxi-6-metil-piridin-3-il)-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida (34) del modo descrito en los pasos de 1 a 5 del ejemplo 1 excepto que, en el paso 5, en lugar del ácido 2-hidroxi-piridin-3-il-borónico se emplea el ácido 2-metoxi-6-metil-piridin-3-il-borónico.

30 Paso 6: En un tubo sellado se calienta a 65°C durante 6,5 h una mezcla de la piridina 34 (80 mg), HBr del 48% (200 µl) y AcOH (3 ml). Se enfría la mezcla reaccionante a t.amb., se vierte sobre una mezcla de EtOAc y agua-hielo. Se neutraliza la mezcla con una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Se separa la fase orgánica, se lava sucesivamente con H₂O y salmuera, se seca (MgSO₄), se filtra y se concentra, obteniéndose 61 mg del compuesto 36 en forma de sólido.

Ejemplo 3

35 N-{4-[7-tert-butil-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-8-metoxi-quinolin-2-il]-fenil}-metano-sulfonamida (38)

40 Se sella un tubo, en el que se han introducido el compuesto 30b (60 mg), uracilo (73 mg), (2-ciano-fenil)-amida del ácido piridina-2-carboxílico (14 mg), CuI (6 mg) y K₃PO₄ (137 mg) en DMSO (5 ml), y se irradia en un reactor de microondas a 150°C durante 5 h. Se enfría la mezcla reaccionante a t.amb. y se ajusta el pH aprox. a 2 con HCl acuoso. Se extrae la mezcla con EtOAc. Se lava el extracto orgánico sucesivamente con H₂O y salmuera, se seca (MgSO₄) y se concentra con vacío. Se purifica el residuo en bruto por cromatografía a través de SiO₂ eluyendo con MeOH al 5% en DCM, obteniéndose 9,3 mg del compuesto 38.

Ejemplo 4

Actividad de la RNA-polimerasa de NS5B del HCV

45 Se mide la actividad enzimática de la polimerasa de HCV (NS5B570n-Con1) en forma de incorporación de monofosfatos de nucleótidos radiomarcados a productos de RNA insolubles en ácido. Se elimina el filtración el sustrato radiomarcado sin incorporar y se añade un centelleante a la placa de filtro lavada y seca que contiene el producto de RNA radiomarcado. La luz emitida por el centelleante es proporcional a la cantidad de producto de RNA generado por la NS5B570n-Con1 en el punto final de la reacción.

50 La polimerasa de HCV, marcada con 6-histidina en el extremo N, se deriva de la cepa Con1 de HCV, genotipo 1b (NS5B570n-Con1), contiene una deleción de 21 aminoácidos en el extremo C con respecto a la polimerasa de HCV de longitud completa y se purifica a partir de la BL21(DE)pLysS de *E. coli*. Se inserta el constructo, que contiene la secuencia codificadora de la cepa Con1 NS5B de HCV (número de acceso al GenBank = AJ242654) en el constructo de plásmido pET17b, en una posición posterior a la cassette de expresión del promotor T7 y se transforma en la *E. coli*. Se cultiva una sola colonia durante una noche como cultivo iniciador y después se emplea para inocular 10 l de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C. Se induce la expresión de proteína por adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,25 mM, cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm se sitúa entre 0,6 y 0,8 y las células se recolectan después de 16-18 h a 30°C. Se purifica la NS5B570n-Con1 hasta homogeneidad empleando un método de purificación de tres pasos, que incluye la posterior cromatografía de columna a través de resinas Ni-NTA, SP-Sepharose HP y Superdex 75.

65 Cada 50 µl de mezcla de reacción enzimática contiene un molde de RNA 20 nM, derivado de la secuencia complementaria del Internal Ribosome Entry Site (IRES), 20 nM de enzima NS5B570n-Con1, 0,5 µCi de UTP tritiada (Perkin Elmer, nº de catálogo: TRK-412; actividad específica: de 30 a 60 Ci/mmol; concentración de la solución patrón: de 7,5x10⁻⁵ M a 20,6x10⁻⁶ M), 1 µM de cada uno de los siguientes: ATP, CTP y GTP; 40 mM Tris-

HCl, de pH 8,0, 40 mM NaCl, 4 mM DTT (ditiotreitól), 4 mM MgCl₂ y 5 µl de compuesto perteneciente a series de diluciones en DMSO. Se reúnen las mezclas reaccionantes en placas de filtro de 96 hoyos (nº de cat. MADVNOB de Millipore Co.) y se incuban a 30°C durante 2 h. Se interrumpen las reacciones por adición de ácido tricloroacético del 10% (v/v) y se incuban a 4°C durante 40 min. Se filtran las mezclas reaccionantes, se lavan con 8 volúmenes de reacción de ácido tricloroacético del 10% (v/v), 4 volúmenes de reacción de etanol del 70% (v/v), se secan con aire y se añaden a cada hoyo de reacción 25 µl de centelleante (Microscint 20, Perkin-Elmer).

Se convierte la cantidad de luz emitida por cada centelleante en cuentas por minutos (CPM) en un lector de placas Topcount® (Perkin-Elmer, intervalo de energía: bajo, modo de eficacia: normal, tiempo de recuento: 1 min, sus-tracción de base: ninguna, reducción de diafonía: desactivada).

Se analizan los datos con Excel® (Microsoft®) y ActivityBase® (idbs®). Se utiliza la reacción en ausencia de enzima para determinar la señal de base, que se resta de las reacciones enzimáticas. Las reacciones de control positivo se realiza en ausencia de compuesto, a partir de ellas se coloca la actividad corregida de base como actividad 100 % de polimerasa. Todos los datos se expresan en forma de porcentaje del control positivo. Se calcula la concentración de compuesto en la que la proporción de la síntesis de RNA catalizada por enzima queda reducida al 50 % (IC₅₀) ajustando la ecuación (i) a los datos del compuesto 38.

$$Y = \% \text{ Min} + \frac{(\% \text{ Max} - \% \text{ Min})}{\left[1 + \frac{X}{(\text{IC}_{50})^S} \right]} \quad (\text{i})$$

a los datos, en la que “Y” corresponde a la actividad enzimática relativa (en %), “%Min” es la actividad enzimática relativa residual en la concentración saturadora de compuesto, “%Max” es la actividad enzimática relativa máxima comparada con el control positivo, X corresponde a la concentración del compuesto y “S” es el coeficiente de Hill (o pendiente).

Ejemplo 5

Ensayo del replicón del HCV

Con este ensayo se mide la capacidad de los compuestos de la fórmula I para inhibir la replicación del RNA del HCV y por consiguiente su potencial utilidad para el tratamiento de infecciones de HCV. El ensayo utiliza un informante (reporter) como lectura simple del nivel intracelular del RNA replicón de HCV. Se introduce el gen de luciferasa de *Renilla* en el primer marco abierto de lectura de un constructo de replicón de replicón NK5.1 (N. Krieger y col., J. Virol. 75(10), 4614, 2001), inmediatamente después de la secuencia del sitio denominado internal ribosome entry site (IRES) y se fusiona con el gen de la fosfotransferasa neomicina (NPTII) mediante un péptido autodestructor 2A obtenido a partir del virus de la glosopeda (M.D. Ryan & J. Drew, EMBO vol. 13(4), 928-933, 1994). Después de la transcripción “in vitro” se somete el RNA a electroporación en células Huh7 de hepatoma humano y se aíslan y expanden colonias resistentes a G418. La línea celular 2209-23 estable elegida contiene el RNA subgenómico replicativo del HCV y la actividad de la luciferasa de *Renilla* expresada por el replicón refleja su nivel de RNA en las células. El ensayo se realiza en placas duplicadas, una en blanco opaco y otra en transparente, con el fin de medir la actividad antivírica y la citotoxicidad de un compuesto químico en paralelo, asegurando que la actividad observada no se debe a una proliferación celular disminuida ni a la muerte celular.

Las células de replicón de HCV de la luciferasa de *Renilla* (2209-23) cultivadas en medio Dulbecco's MEM (Invitrogen, nº de catálogo: 10569-010) con un 5% de suero fetal bovino (FCS, Invitrogen, nº de catálogo: 10082-147) se introducen en placas de 96 hoyos a razón de 5000 células por hoyo y se incuban durante una noche. Veinticuatro horas después se añaden los compuestos químicos en diferentes diluciones en el medio de cultivo a las células, que a partir de este momento se incuban a 37°C durante tres días. Al término del período de incubación se recolectan las células de las placas blancas y se mide la actividad de luciferasa utilizando un sistema de ensayo llamado *R. luciferase* assay system (Promega, nº de catálogo: E2820). Todos los reactivos mencionados en el párrafo siguiente se incluyen en el kit del fabricante y se siguen las instrucciones del fabricante para preparar los reactivos. Se lavan las células una vez con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0) (PBS) por hoyo y se lisan con 20 µl de 1x tampón de lisis del ensayo de *R. luciferase* antes de la incubación a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación se inserta la placa en un luminómetro de microplacas del tipo Centro LB 960 (Berthold Technologies) y se inyectan en cada hoyo 100 µl de del tampón de ensayo de *R. luciferase* y se mide la señal utilizando un programa de demora 2 segundos y medición 2 segundos. La IC₅₀, la concentración de fármaco requerida para reducir el nivel de replicón en un 50 % con respecto al valor de control celular no tratado, puede calcularse a partir de la curva de la reducción de la actividad de la luciferasa en porcentaje frente a la concentración de fármaco del modo antes descrito.

En el ensayo de citotoxicidad se emplea el reactivo WST-1 de Roche Diagnostics (nº de catálogo: 1644807). Se añaden diez microlitros de reactivo WST-1 a cada hoyo, incluidos los hoyos que solamente contienen medio como

hoyos en blanco. Después se incuban las células a 37°C durante 2 h y se mide el valor de la densidad óptica (OD) con un lector de placas del tipo MRX Revelation (Lab System) a 450 nm (filtro de referencia a 650 nm). A su vez, la CC₅₀, la concentración de fármaco requerida para reducir la proliferación celular en un 50% en relación con el valor de control de células no tratadas, puede calcularse a partir de la curva de reducción del valor de WST-1 en porcentaje frente a la concentración de fármaco, descrita anteriormente.

5

Tabla II

| Compuesto número | Actividad de replicón de HCV, IC ₅₀ (µM) | Actividad citotóxica CC ₅₀ (µM) |
|------------------|---|--|
| I-3 | 0,017 | 44 |

Ejemplo 6

10 En este ejemplo se describen las composiciones farmacéuticas de los compuestos objeto de la invención para la administración por diferentes vías.

Composición para la administración oral (A)

| Ingrediente | % p./p. |
|---------------------|---------|
| ingrediente activo | 20,0% |
| lactosa | 79,5% |
| estearato magnésico | 0,5% |

Se mezclan los ingredientes y se envasan en cápsulas que contienen aprox. 100 mg cada una; una cápsula contiene aprox. la dosis diaria total.

15

Composición para la administración oral (B)

| Ingrediente | % p./p. |
|----------------------------|---------|
| ingrediente activo | 20,0% |
| estearato magnésico | 0,5% |
| croscarmelosa sódica | 2,0% |
| lactosa | 76,5% |
| PVP (polivinilpirrolidona) | 1,0% |

Se mezclan los ingredientes y se granulan empleando un disolvente, por ejemplo el metanol. A continuación se seca la formulación y se moldea en forma de tabletas (que contienen aprox. 20 mg del compuesto activo) con una máquina apropiada para la fabricación de las tabletas.

20

Composición para la administración oral (C)

| Ingrediente | cantidad |
|-------------------------------|--------------|
| compuesto activo | 1,0 g |
| ácido fumárico | 0,5 g |
| cloruro sódico | 2,0 g |
| metil-paraben | 0,15 g |
| propil-paraben | 0,05 g |
| azúcar granulado | 25,5 g |
| sorbita (solución al 70%) | 12,85 g |
| Veegum K (Vanderbilt Co.) | 1,0 g |
| aromas | 0,035 ml |
| colorantes | 0,5 mg |
| agua destilada, cantidad suf. | hasta 100 ml |

Se mezclan los ingredientes para formar una suspensión destinada a la administración oral.

25

Formulación parenteral (D)

| Ingrediente | cantidad |
|---------------------|---------------------------------|
| ingrediente activo | 0,25 g |
| cloruro sódico | cant. suficiente hasta isotonía |
| agua para inyección | hasta 100 ml |

Se disuelve el ingrediente activo en una porción del agua para inyección. Se añade una cantidad suficiente de cloruro sódico con agitación hasta conseguir una solución isotónica. Se completa el peso de la solución con el resto de agua de para inyección, se filtra a través de un filtro de membrana de 0,2 micras y se envasa en condiciones estériles.

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto elegido entre el grupo formado por:
 - 5 N-{4-[7-tert-butil-8-metoxi-5-(2-oxo-1,2-dihidro-piridin-3-il)-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida; N-{4-[7-tert-butil-8-metoxi-5-(6-metil-2-oxo-1,2-dihidro-piridin-3-il)-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida; y N-{4-[7-tert-butil-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-8-metoxi-quinolin-2-il]-fenil}-metanosulfonamida; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 10 2. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso como sustancia terapéuticamente activa.
 3. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o la profilaxis de la infección del virus de la hepatitis C (HCV).
- 15 4. Un compuesto según la reivindicación de 1 para el uso en el tratamiento o la profilaxis de la infección del virus de la hepatitis C (HCV).