

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 090**

51 Int. Cl.:

**A61P 31/14** (2006.01)  
**A61K 38/06** (2006.01)  
**A61K 38/07** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**C07K 5/08** (2006.01)  
**C07K 5/10** (2006.01)  
**C07K 5/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 12181546 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2540350**

54 Título: **Combinaciones de un compuesto de quinoxalina macrocíclica que es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC con otros agentes del VHC**

30 Prioridad:

**22.07.2008 US 135559 P**

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

**05.09.2014**

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)**  
**126 East Lincoln Avenue**  
**Rahway, NJ 07065, US y**  
**MSD ITALIA S.R.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARPER, STEVEN;**  
**SUMMA, VINCENZO;**  
**LIVERTON, NIGEL J. y**  
**MCCAULEY, JOHN A.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 491 090 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

Combinaciones de un compuesto de quinoxalina macrocíclica que es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC con otros agentes del VHC

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos macrocíclicos que son útiles como inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (VHC), la síntesis de dichos compuestos y al uso de dichos compuestos para tratar la infección por VHC y/o reducir la probabilidad o la gravedad de la infección por VHC

10

**Antecedentes de la invención**

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud importante que conduce a enfermedad hepática crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular en un número importante de individuos infectados. Los tratamientos actuales para la infección por VHC incluyen inmunoterapia con interferón- $\alpha$  recombinante en solitario o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina.

15

Varias enzimas codificadas por virus son supuestas dianas para intervención terapéutica, incluyendo una metaloproteasa (NS2-3), una serina proteasa (NS3), una helicasa (NS3) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5B). La proteasa NS3 se localiza en el dominio N-terminal de la proteína NS3. NS4A proporciona un cofactor para la actividad de NS3.

20

Los posibles tratamientos para la infección por VHC se han tratado en las diferentes referencias, incluyendo Balsano, Mini Rev. Med. Chem. 8(4):307-318, 2008, Rönn et al., Current Topics in Medicinal Chemistry 8:533-562, 2008, Sheldon et al., Expert Opin. Investig. Drugs 16(8):1171-1181, 2007, y De Francesco et al., Antiviral Research 58:1-16, 2003.

25

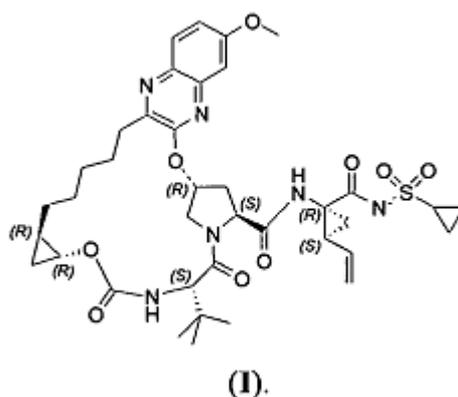
**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto macrocíclico de fórmula (I) y/o sales farmacéuticamente del mismo. El compuesto y sus sales son inhibidores de la proteasa NS3 del VHC. El compuesto y sus sales tienen aplicaciones terapéuticas y de investigación.

30

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

35



La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la presente invención y métodos para preparar dichas composiciones farmacéuticas. Además, la presente invención describe métodos para tratar o reducir la probabilidad o gravedad de la infección por VHC.

40

Otras realizaciones, aspectos y características de la presente invención se describen adicionalmente o serán evidentes a partir de la siguiente descripción, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

45

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. El compuesto y sus sales farmacéuticamente aceptables son útiles en la inhibición de la proteasa NS3 del VHC, el tratamiento de la infección por VHC y/o la reducción de la probabilidad o gravedad de la infección por VHC.

50

Aplicaciones profilácticas incluyen, por ejemplo, tratamiento tras sospecha de exposición pasada al VHC por medios tales como transfusión de sangre, intercambio de fluidos corporales, mordiscos, punciones accidentales con agujas o exposición a la sangre de un paciente durante cirugía.

5 Como ingredientes de la composición farmacéutica, los compuestos y sales pueden ser el agente terapéutico primario. Cuando sea adecuado se puede combinar con otros agentes terapéuticos, incluidos, entre otros, antivirales del VHC, antiinfecciosos, inmunomoduladores, antibióticos o vacunas.

10 Los inhibidores de NS3 son también útiles en la preparación y ejecución de ensayos de exploración para compuestos antivirales. Por ejemplo, dichos compuestos se pueden usar para aislar mutantes enzimáticos, que son excelentes herramientas de exploración para compuestos antivirales más potentes. Además, los compuestos se pueden usar para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos antivirales frente al VHC, por ejemplo, por inhibición competitiva.

15 Como se describe en el Ejemplo 2, el compuesto de fórmula (I) se comparó con el compuesto de los Ejemplos 110 y 118 del documento WO 2008/057209 y tiene varias ventajas.

### I. Composiciones y Métodos

20 Las diferentes realizaciones incluyen lo siguiente:

- (a) Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (b) La composición farmacéutica de (a), que comprende además un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en agentes antivirales de VHC, inmunomoduladores y agentes antiinfecciosos.
- (c) La composición farmacéutica de (b), en la que el agente antiviral del VHC es un antiviral seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la proteasa del VHC e inhibidores de polimerasa NS5B de VHC.
- (d) Una combinación farmacéutica que es (i) un compuesto de fórmula I y (ii) un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en agentes antivirales de VHC, inmunomoduladores y agentes antiinfecciosos; en la que el compuesto de fórmula I y el segundo agente terapéutico se emplean cada uno en una cantidad que hace la combinación eficaz para inhibir la proteasa NS3 de VHC o para tratar y/o prevenir y/o reducir la probabilidad o gravedad de la infección por VHC.
- (e) La composición de (d), en la que el agente antiviral del VHC es un antiviral seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la proteasa de VHC e inhibidores de polimerasa de NS5B del VHC.
- (f) Una composición farmacéutica para uso en un método para inhibir la proteasa NS3 de VHC en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I.
- (g) Una composición farmacéutica para uso en un método para tratar una infección por VHC y/o reducir la probabilidad o gravedad de la infección por VHC en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).
- (h) Una composición farmacéutica para uso en un método de (g), en el que el compuesto de fórmula (I) se administra en combinación con una cantidad eficaz de al menos un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en agentes antivirales de VHC, inmunomoduladores y agentes antiinfecciosos.
- (i) Una composición farmacéutica para uso en un método de (h), en el que el agente antiviral de VHC es un antiviral seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de proteasa de VHC e inhibidores de polimerasa de NS5B de VHC.
- (j) Una composición farmacéutica para uso en un método para inhibir la proteasa NS3 de VHC en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de (a), (b) o (c) o la combinación de (d) o (e).
- (k) Una composición farmacéutica para uso en un método para tratar una infección por VHC y/o reducir la probabilidad o la gravedad de la infección por VHC en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de (a), (b) o (c) o la combinación de (d) o (e).
- (l) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para uso como un medicamento, para uso en la prevención o el tratamiento de la infección por VHC o para uso (i) en, (ii) como un medicamento para, o (iii) para uso en la preparación de un medicamento para: (a) inhibir la proteasa NS3 de VHC, o (b) tratar una infección por VHC y/o reducir la probabilidad o la gravedad de la infección por VHC. En estos usos, los compuestos de la presente invención se pueden emplear opcionalmente en combinación con uno o más segundos agentes terapéuticos seleccionados de agentes antivirales de VHC, agentes antiinfecciosos e inmunomoduladores.

60 En todas estas realizaciones, el compuesto se puede usar opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

65 Como se usa en el presente documento, el término "o" indica alternativas que, cuando sea adecuado, se pueden combinar. Por tanto, el término "o" incluye cada alternativa indicada por separado además de su combinación si la combinación no es mutuamente excluyente.

Una referencia a un compuesto también incluye complejos estables del compuesto, tal como un hidrato estable. Un compuesto "estable" es un compuesto que se puede preparar y aislar y cuya estructura y propiedades permanecen o se pueden causar que permanezcan esencialmente sin cambios durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el uso del compuesto para los fines descritos en este documento (por ejemplo, administración terapéutica o profiláctica a un sujeto).

## II. Administración y composiciones

El término "administración" y variantes del mismo (por ejemplo, "administrar" un compuesto) significa proporcionar el compuesto o un profármaco del compuesto al individuo que necesite tratamiento. Cuando un compuesto de la invención o un profármaco del mismo se proporciona en combinación con otro o más agentes activos (por ejemplo, agentes antivirales útiles para tratar una infección por VHC), se entiende que la "administración" y sus variantes incluyen cada una el suministro concurrente y secuencial del compuesto o sal y otros agentes

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto parental que tiene actividad y que no es indeseable ni biológicamente ni de otro modo (por ejemplo, no es tóxica ni perjudicial de otro modo para el destinatario de la misma). Las sales adecuadas incluyen sales de adición de ácido que, por ejemplo, se pueden formar mezclando de una solución del compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido benzoico. Los compuestos que llevan un resto ácido, se pueden mezclar con sales farmacéuticamente aceptables adecuadas para proporcionar, por ejemplo, sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio o potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio o de magnesio) y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados tales como sales de amonio cuaternario. Además, en el caso de que esté presente un grupo ácido (-COOH) o alcohol, se pueden emplear ésteres farmacéuticamente aceptables para modificar las características de solubilidad o hidrólisis del compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "profármaco" pretende incluir una forma o un compuesto inactivas del fármaco que se convierte en la forma o compuesto activo mediante la acción de enzimas agentes químicos o procesos metabólicos en el cuerpo de un individuo al que se le administra.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende incluir un producto que comprende los ingredientes especificados así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de combinar los ingredientes especificados.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que los ingredientes de la composición farmacéutica deben ser compatibles entre sí y no perjudiciales para el destinatario de la misma.

"El término "sujeto" (alternativamente denominado en el presente documento "paciente") como se usa en este documento se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, que ha sido el objeto de un tratamiento, una observación o un experimento.

La expresión "cantidad eficaz" indica una cantidad que ejerce un efecto profiláctico o terapéutico. Para un paciente infectado por VHC, una cantidad eficaz es suficiente para alcanzar uno o más de los siguientes efectos: reducir la capacidad del VHC para replicarse, reducir la carga del VHC e incrementar el aclaramiento viral. Para un paciente no infectado por VHC, una cantidad eficaz es suficiente para alcanzar uno o más de los siguientes: una menor susceptibilidad a la infección por VHC y una capacidad menor de que el virus infeccioso establezca la infección persistente para enfermedad crónica.

Para el fin de inhibir la proteasa NS3 de VHC y tratar una infección por VHC y/o reducir la probabilidad o la gravedad de los síntomas de la infección por VHC, los compuestos de la presente invención, opcionalmente en forma de una sal, se pueden administrar por cualquier medio que produzca contacto del agente activo con el sitio de acción del agente. Se pueden administrar por cualquier medios convencionales disponibles para usar junto con compuestos farmacéuticos, como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. Se pueden administrar en solitario, pero normalmente se administran con un vehículo farmacéutico seleccionado basándose en la vía de administración seleccionada y a la práctica farmacéutica convencional.

Los compuestos de la invención se pueden administrar, por ejemplo, por una o más de las vías siguientes: oral, parenteral (incluyendo inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión), inhalación (tal como por pulverización) o por vía rectal, en forma de una dosificación unitaria de una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz del compuesto y vehículos, adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. Las preparaciones líquidas adecuadas para administración oral (por ejemplo, suspensiones, jarabes, elixires y similares) se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y pueden emplear cualquiera de los medios habituales tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares. Las preparaciones sólidas adecuadas para administración oral (por ejemplo, polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos) se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la

técnica y pueden emplear excipientes sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Las composiciones parenterales se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y normalmente emplean agua estéril como vehículo y, opcionalmente, otros ingredientes tales como adyuvantes de la solubilidad. Las soluciones inyectables se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica en los que el vehículo comprende una solución salina, una solución de glucosa o una solución que contiene una mezcla de solución salina y glucosa. Guía adicional para los procedimientos adecuados para usar en la preparación de composiciones farmacéuticas de la presente invención y de ingredientes adecuados para usar en dichas composiciones se proporciona en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>a</sup> edición (ed. A. R Gennaro, Mack Publishing Co., 2000).

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral en un intervalo de dosificación de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal de mamífero (por ejemplo, ser humano) al día en una sola dosis o en dosis divididas. Un intervalo de dosificación preferido es de 0,01 a 500 mg/kg de peso corporal al día por vía oral en una sola dosis o en dosis divididas. Otro intervalo de dosificación es de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal al día por vía oral en dosis individuales o divididas. Para administración oral, las composiciones pueden ser proporcionadas en forma de comprimidos o cápsulas que contienen de 1,0 a 500 miligramos del ingrediente activo, particularmente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. El nivel de dosis específica y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variar y dependerán de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado general, sexo, dieta, modo y momento de administración, velocidad de excreción, combinación farmacológica, la gravedad de la afección particular y el huésped que se está sometiendo a terapia.

### III. Tratamiento de combinación

Los compuestos macrocíclicos de quinoxalina descritos en el presente documento se pueden usar en un tratamiento de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen los dirigidos al VHC, dirigidos a un agente causante de la enfermedad diferente o los potenciadores del sistema inmunitario. Agentes que potencian el sistema inmunitario incluyen los que generalmente potencian el sistema inmunitario y los que producen una respuesta inmunitaria específica contra el VHC. Los agentes terapéuticos adicionales dirigidos contra el VHC incluyen agentes dirigidos contra la NS3 y los agentes dirigidos a otras actividades del VHC tales como NS5A y NS5B y los agentes dirigidos a las actividades de la célula huésped implicadas en la replicación del VHC.

Diferentes inhibidores del VHC se describen en diferentes publicaciones. Los compuestos macrocíclicos útiles como inhibidores, inhibidores de la proteasa del VHC se describen en el documento WO06/119061, el documento WO7/015785, el documento WO7/016441, el documento WO07/148135, el documento WO08/051475, el documento WO 08/051477, el documento WO 08/051514, el documento WO 08/057209. Otros inhibidores de la proteasa NS3 del VHC se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 98/22496, WO 98/46630, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/38888, WO 99/50230, WO 99/64442, WO 00/09543, WO 00/59929, WO 02/48116, WO 02/48172, la patente británica N<sup>o</sup> GB 2 337 262, y la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.323.180.

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden estar presentes en una combinación incluyen ribavirina, levovirina, viramidina, timosina alfa-1, interferón- $\beta$ , interferon- $\alpha$ , interferón- $\alpha$  pegilado (peginterferón-a), una combinación de interferon- $\alpha$  y ribavirina, una combinación de peginterferón- $\alpha$  y ribavirina, una combinación de interferon- $\alpha$  y levovirina y una combinación de peginterferón- $\alpha$  y levovirina. El interferón- $\alpha$  incluye, pero sin limitación, interferón- $\alpha$ 2a recombinante (tal como interferón Roferon disponible en Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), interferón- $\alpha$ 2a pegilado (Pegasys), interferón- $\alpha$ 2b (tal como interferón Intron-A disponible en Schering Corp., Kenilworth, NJ), interferón- $\alpha$ -2b pegilado (PegIntron), un interferón de consenso recombinante (tal como interferón alfacón-1), y un producto de interferón- $\alpha$  purificado. El interferón de consenso recombinante de Amgen tiene el nombre comercial Infergen®. La levovirina es el L-enantiómero de la ribavirina que ha demostrado una actividad inmunomoduladora similar a ribavirina. La viramidina representa un análogo de ribavirina que se describe en el documento WO 01/60379. Los componentes individuales de la combinación se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el transcurso de la terapia o simultáneamente en formas de combinación divididas o individuales.

La ribavirina, levovirina y viramidina pueden ejercer sus efectos anti-VHC por modulación de combinaciones intracelulares de nucleótidos de guanina por inhibición de la enzima intracelular inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). La IMPDH es la enzima limitante de velocidad en la ruta biosintética de nucleótidos de guanina de novo. La ribavirina se fosforila fácilmente intracelularmente y el derivado monofosfato es un inhibidor de IMPDH. Por lo tanto, la inhibición de IMPDH representa otra diana útil para el descubrimiento de inhibidores de la replicación de VHC. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con el inhibidor de IMPDH, tal como VX-497, que se describe en el documento WO 97/41211 y WO 01/00622; otro inhibidor de IMPDH tal como el descrito en el documento WO 00/25780; o micofenolato de mofetilo [véase A. C. Allison y E. M. Eugui, Agents Action, 44 (Supl.): 165 (1993)].

Para el tratamiento de una infección por VHC, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con el agente antiviral amantadina (1-aminoadamantano). Para una descripción completa de este agente, véase J. Kirschbaum, 12 Anal. Profiles Drug Subs. 1-36 (1983).

- 5 Para el tratamiento de una infección por VHC, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con el agente antiviral inhibidor de polimerasa R7128 (Roche).

Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar para el tratamiento de una infección por VHC con ribonucleósidos 2'-C-ramificados antivirales descritos en R. E. Harry-O'kuru, y col., J. Org. Chem., 62:1754-1759 (1997); M. S. Wolfe, y col., Tetrahedron Lett, 36: 7611-7614 (1995); Patente de Estados Unidos N° 3.480.613; el Número de Publicación Internacional WO 01/90121, los documentos WO 01/92282 WO 02/32920 (25 de abril de 2002); WO 04/002999 y WO 04/003000 y WO 04/002422. Dichos ribonucleósidos 2'-C-ramificados incluyen, pero sin limitación, 2'-C-metil-citidina, 2'-C-metil-uridina, 2'-C-metil-adenosina, 2'-C-metil-guanosina y 9-(2'-C-metil-β-D-ribofuranosil)-2,6-diaminopurina y el éster de aminoácido correspondiente de los hidroxilos C-2', C-3' y C-5' de ribosa y los ésteres de 1,3-propanodiol cíclico opcionalmente sustituido correspondientes de los derivados 5'-fosfato.

Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar para el tratamiento de una infección por VHC con otros nucleósidos que tienen propiedades anti-VHC, tales como los descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 02/51425, WO01/79246, WO02/32920, WO02/48165 y WO2005/003147 (incluyendo R1656, (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina, mostrados como los compuestos 3-6 en la página 77); el documento WO 01/68663; el documento WO 99/43691; el documento WO 02/18404 y el documento WO2006/021341, y la solicitud de patente de Estados Unidos US 2005/0038240, incluyendo 4'-azido nucleósidos tales como R1626, 4'-azidocitidina; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos US 2002/0019363, US 2003/0236216, US 2004/0006007 y US 2004/0063658; y las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 02/100415, WO 03/026589, WO 03/026675, WO 03/093290, WO 04/011478, WO 04/013300 y WO 04/028481.

Para el tratamiento de una infección por VHC, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con un agente que sea un inhibidor de la polimerasa NS5B de VHC. Dichos inhibidores de la polimerasa NS5B de VHC que se pueden usar como terapia de combinación incluyen, pero sin limitación, los descritos en las publicaciones de patente internacional WO02/057287, WO02/057425, WO03/068244, WO2004/000858, WO04/003138 y WO2004/007512; la patente de Estados Unidos N° 6.777.392 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° US2004/0067901. Otros inhibidores de la polimerasa de VHC de este tipo incluyen, pero sin limitación, valopicitabina (NM-283; Idenix) y 2'-F-2'-beta-metilcitidina (véase también el documento WO 2005/003147).

En una realización, los inhibidores nucleosídicos de la polimerasa NS5B de VHC que se usan en combinación con los presentes inhibidores de la proteasa NS3 de VHC se seleccionan de los siguientes compuestos: 4-amino-7-(2-C-metil-β-D-arabinofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-metilamino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-dimetilamino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-ciclopropilamino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2-C-vinil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2-C-hidroximetil-o-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2-C-fluorometil-o-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-5-metil-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; ácido 4-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-carboxílico; 4-amino-5-bromo-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-5-fluoro-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 2,4-diamino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 2-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 2-amino-4-ciclopropilamino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 2-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona; 4-amino-7-(2-C-etil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2-C,2-O-dimetil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona; 2-amino-5-metil-7-(2-C,2-O-dimetil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona; 4-amino-7-(3-desoxi-2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(3-desoxi-2-C-metil-β-D-arabinofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-2-fluoro-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(3-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(3-C-metil-β-D-xilofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(2,4-di-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; 4-amino-7-(3-desoxi-3-fluoro-2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina; y los 5'-trifosfatos correspondientes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar para el tratamiento de una infección por VHC con inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa de VHC tales como los descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 01/77091; WO 01/47883; WO 02/04425; WO 02/06246; WO 02/20497; WO 2005/016927 (en concreto JTK003); y VHC-796 (Viropharma Inc.).

En una realización, los inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B de VHC que se usan en combinación con los presentes inhibidores de la proteasa NS3 de VHC se seleccionan de los siguientes compuestos: ácido 14-

ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-(2-morfolin-4-iletel)-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-3-metoxi-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-3-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; metil(((14-ciclohexil-3-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-il)carbonil)amino)sulfonil)acetato; ácido (((14-ciclohexil-3-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-il)carbonil)amino)sulfonil) acético; 14-ciclohexil-N-[(dimetilamino)sulfonil]-3-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxamida; ácido 3-cloro-14-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5] benzodiazocin-11-carboxílico; bis(trifluoroacetato) de N-(11-carboxi-14-ciclohexil-7,8-dihidro-6H indolo[1,2-e][1,5] benzoxazocin-7-il)-N,N-dimetiletano-1,2-diaminio; ácido 14-ciclohexil-7,8-dihidro-6H-indolo[1,2-e][1,5]benzoxazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-metil-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-3-metoxi-6-metil-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-3-metoxi-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-[3-(dimetilamino)propil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-7-oxo-6-(2-piperidin-1-iletel)-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-(2-morfolin-4-iletel)-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-[2-(dietilamino)etil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-(1-metilpiperidin-4-il)-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; 14-ciclohexil-N-[(dimetilamino)sulfonil]-7-oxo-6-(2-piperidin-1-iletel)-5,6,7,8-tetrahidroindolo [2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxamida; 14-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-N-[(dimetilamino)sulfonil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxamida; ácido 14-ciclopentil-6-[2-(dimetilamino)etil]-7-oxo-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-5,6,7,8-tetrahidroindolo [2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 6-alil-14-ciclohexil-3-metoxi-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclopentil-6-[2-(dimetilamino)etil]-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 14-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-5,6,7,8-tetrahidroindolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-11-carboxílico; ácido 13-ciclohexil-5-metil-4,5,6,7-tetrahidrofuro[3',2':6,7][1,4]diazocino[1,8-a]indol-10-carboxílico; ácido 15-ciclohexil-6-[2-(dimetilamino)etil]-7-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-indolo[2,1-a][2,6]benzodiazocin-12-carboxílico; ácido 15-ciclohexil-8-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-indolo[2,1-a][2,5]benzodiazocin-12-carboxílico; ácido 13-ciclohexil-6-oxo-6,7-dihidro-5H-indolo[1,2-d][1,4]benzodiazepin-10-carboxílico; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

#### IV. Evaluación de los compuestos

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden evaluar según diferentes actividades, tales como la capacidad para inhibir la actividad de NS3 del VHC, la actividad del replicón del VHC y la actividad de replicación del VHC usando técnicas bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Carroll et al., J. Biol. Chem. 278:11979-11984, 2003.)

Uno de dichos ensayos es el ensayo de fluorescencia con resolución temporal de la proteasa NS3 del VHC (TRF) como se describe más adelante y en Mao et al., Anal. Biochem. 373:1-8, 2008 y en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2006/102087. Un ensayo de la proteasa NS3 se puede realizar, por ejemplo, en un volumen fina del tampón de ensayo de 100 ml que contiene HEPES 50 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, 15 % de glicerol, 0,15 % TRITON X-100, 10 mM DTT, y 0,1 % PEG 8000. La proteasa NS3 y NS4A se preincuba con varias concentraciones de inhibidores en DMSO durante 30 minutos. La reacción se inicia añadiendo el sustrato peptídico TRF (concentración final 100 nM). La hidrólisis del sustrato por la actividad proteasa de NS3 se inactiva tras 1 hora a temperatura ambiente con 100 ml de HEPES 500 mM a pH 5,5. El producto fluorescente se detectó usando un Victor V2 o fluorímetro de Fusión (Perkin Elmer Life y Analytical Sciences) con excitación a 340 nm y emisión a 615 nm con un retraso de 400  $\mu$ s. Las concentraciones de ensayo de diferentes formas enzimáticas se seleccionaron con una relación de señal respecto a fondo de 10-30. Los valores de CI<sub>50</sub> obtuvieron usando un ajuste de cuatro parámetros. Los valores K<sub>i</sub> derivan de los valores de CI<sub>50</sub> usando la fórmula siguiente,

$$CI_{50} = K_i (1 + [S] / K_M), \quad \text{Ecn (1)}$$

en la que [S] es la concentración del sustrato peptídico en la reacción y K<sub>M</sub> es la constante de Michaelis. Véase Gallinari et al., 38 BIOCHEM. 5620-32(1999); P. Gallinari et al., 72 J. VIROL. 6758-69 (1998); M. Taliani et al., 240 ANAL. BIOCHEM. 60-67 (1996); Mao et al., Analytical Biochemistry 373: 1-8, 2008.

#### V. Producción de compuestos generales

La presente invención también se refiere a procedimientos para preparar compuestos de fórmula (I). Los compuestos de la presente invención se pueden preparar fácilmente de acuerdo con los siguientes esquemas de reacción y ejemplos o modificaciones de los mismos, usando materiales de partida y reactivos fácilmente disponibles en el mercado y procedimientos de síntesis convencionales. En estas reacciones, también es posible hacer uso de variantes que son conocidas entre los especialistas en la técnica, pero no se mencionan en más detalle. Además, otros procedimientos para preparar los compuestos de la invención serán fácilmente evidentes para una persona

especialista en la técnica a la luz de los siguientes esquemas de reacción y ejemplos. A menos que se indique otra cosa, todas las variables son como se han definido anteriormente. Los siguientes esquemas de reacción y ejemplos sólo sirven para ilustrar la invención y su práctica.

5 Los catalizadores de metátesis de olefina incluyen las siguientes especies a base de rutenio: F. Miller et al., 118 J. AM. CHEM. Soc. 9606 (1996); G. Kingsbury et al., 121 J. Am. Chem. Soc. 791 (1999); H. Scholl et al., 1 ORG. LETT. 953 (1999); solicitud de patente de Estados Unidos US2002/0107138; K. Furstner et al., 64 J. ORG. CHEM. 8275 (1999). La utilidad de estos catalizadores en la metátesis de cierre de anillo se conoce bien en la bibliografía (por ejemplo, Trnka y Grubbs, 4 ACC. CHEM. RES. 18 (2001).

10 Los siguientes ejemplos sólo sirven para ilustrar la invención y su práctica. Los ejemplos no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención.

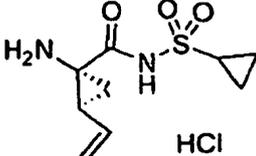
### Lista de abreviaturas

15 Lista de abreviaturas

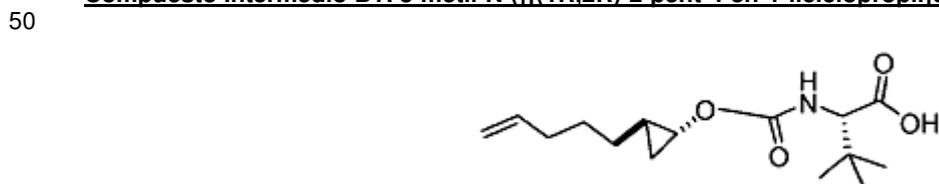
	DCM / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
	DCE	1,2 dicloroetano
20	DIEA	diisopropiletilamina
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	Dppf	difenilfosfinoferroceno
	Et <sub>2</sub> O	éter dietílico
25	EtOAc	acetato de etilo
	HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HCl	ácido clorhídrico
	TMSCl	Clorotrimetilsilano
	TBAF	Fluoruro de tetra-butil amonio
30	DMAP	Dimetilamino piridina
	MeCN	acetonitrilo
	MeOH	metanol
	Pd/C	paladio sobre carbono
	TBTU	Tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio
35	TFA	Ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	Cromatografía ultrarrápida	Purificación usando Biotage Horizon con cartucho de gel de sílice y gradiente de fase móvil especificado
40	HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento con masa automática o desencadenada por UV usando MeCN acidificado y gradientes de H <sub>2</sub> O como fase móvil
	MHz	Megahertzios

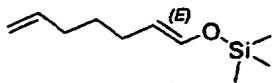
### Síntesis de compuestos intermedios

45 Compuestos Intermedios A

Nº de Compuesto Intermedio	Estructura	Nombre	Referencia bibliográfica Wang et al., Patente de Estados Unidos Nº 6.995.174
A1		Clorhidrato de (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-1-amino-N-(ciclopropilsulfonyl)-2-vinilciclopropanocarboxamida	

### Compuesto Intermedio B1: 3-metil-N-(((1*R*,2*R*)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil)oxi)carbonil-L-valina



Etapa 1: [(1E)-hepta-1,6-dien-1-iloxi](trimetil)silano

5 Una solución (0,5 M) de bromuro de butenil magnesio en THF (1,4 eq.) se trató a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  con  $\text{Cu(I)Br}\cdot\text{SMe}_2$  (0,05 eq) y HMPA (2,4 eq). La mezcla se agitó durante 10 min y, después, se añadió una solución (1 M) de acroleína (1 eq) y TMSCI (2 eq) en THF durante 1 hora de forma que la temperatura interna permaneció por debajo, de  $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La mezcla resultante se agitó a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas y después se trató con un exceso de  $\text{Et}_3\text{N}$  y se diluyó con hexanos. Después de alcanzar la temperatura ambiente, la mezcla se trató con una porción pequeña de  $\text{H}_2\text{O}$  y se filtró a través de CELITE. El filtrado se lavó 10 veces con  $\text{H}_2\text{O}$  y se después con salmuera. La capa orgánica se secó y los volátiles se eliminaron, dando un residuo que se destiló a presión reducida (2 kPa). La fracción recogida a  $80\text{--}86\text{ }^{\circ}\text{C}$  contenía el compuesto del título (58 %) en forma de un líquido incoloro. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,19 (d,  $J = 11,6\text{ Hz}$ , 1H), 5,85 - 5,75 (m, 1H), 5,02 - 4,92 (m, 3H), 2,08 - 2,02 (m, 2H), 1,94 - 1,88 (m, 2H), 1,46 - 1,38 (m, 2H), 0,18 (s, 9H).

15

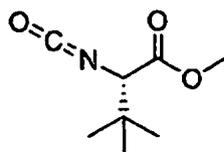
Etapa 2: trans-2-pent-4-en-1-ilciclopropanol

20 Una solución (0,45 M) del compuesto anterior en hexanos se trató con una solución (15 %) de  $\text{Et}_2\text{Zn}$  (1,2 eq) en tolueno y la solución resultante se enfrió en un baño de hielo. Gota a gota se añadió diyodometano (1,2 eq), después la solución se agitó durante 1 hora antes de calentar hasta  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se añadió piridina (6 eq) y la pasta se agitó durante 15 min y se vertió en éter de petróleo. La mezcla se filtró repetidamente a través de celite hasta obtener una solución transparente. Esta mezcla se concentró a 10 kPa y la solución que permaneció (que contenía [(trans)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)silano, tolueno y piridina) se diluyó además con THF. La mezcla se enfrió hasta  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se trató gota a gota con una solución de TBAF (1M (1,2 eq) en THF. Tras 10 minutos la mezcla se dejó calentar hasta  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y tras 1 h más se vertió en  $\text{H}_2\text{O}$ . La fase acuosa se extrajo con  $\text{EtOAc}$  y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, después se secaron. La eliminación de los volátiles dio un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 0-66 %  $\text{Et}_2\text{O}$ /éter de petróleo) para dar el compuesto del título (71 %) como líquido incoloro. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,85 - 5,75 (m, 1H), 5,00 (dd,  $J = 17,1, 1,6\text{ Hz}$ , 1H), 4,94 (d a,  $J = 10,4\text{ Hz}$ , 1H), 3,20 (aparente dt,  $J = 6,4, 2,5\text{ Hz}$ , 1H), 2,10 - 2,04 (m, 2H), 1,52 - 1,44 (m, 2H), 1,29 - 1,19 (m, 1H), 1,15 - 1,07 (m, 1H), 0,95 - 0,87 (m, 1H), 0,71 - 0,66 (m, 1H), 0,31 (aparente c,  $J = 6,0\text{ Hz}$ , 1H).

30

Etapa 3: 3-metil-N-(oxometileno)-L-valinato de metilo

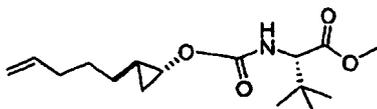
35



40

Una solución (0,39 M) de 3-metil-L-valinato de metilo en una mezcla de 2:1 de  $\text{NaHCO}_3$  saturado y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se enfrió en un baño de hielo y se agitó rápidamente. La mezcla se trató con trifosgeno (0,45 eq) en una porción y la mezcla resultante se agitó durante 0,5 h. La reacción se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se separaron las capas. La fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, después se secaron. La eliminación del disolvente dio el compuesto del título en forma de un aceite transparente que se mantuvo durante 12 h al vacío (0,01 kPa) y después se usó directamente en la etapa siguiente. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,79 (s, 3H), 3,75 (s, 1H), 1,00 (s, 9H).

45

Etapa 4: 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valinato de metilo y 3-metil-N-(((1S,2S)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valinato de metilo

50

Una solución (0,45 M) *trans*-2-pent-4-en-1-ilciclopropanol en tolueno se trató con 3-metil-N-(oxometileno)-L-valinato de metilo (1,1 eq) y después DMAP (1 eq). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 horas, después se enfrió hasta  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se añadieron  $\text{EtOAc}$  y la capa orgánica se separó y se lavó con HCl 1N, salmuera, y se secó. La eliminación de los volátiles dio un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 0-30 %  $\text{Et}_2\text{O}$ /éter de petróleo). Las primeras fracciones contenían 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-

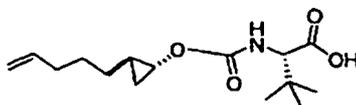
55

iliciclopropil]oxi}carbonil)-L-valinato de metilo (38 %) como un aceite. EM (ES+, m/z) 298 (M+H)<sup>+</sup>.

Las últimas fracciones contenían 3-metil-N-(((1R,2S)-2-pent-4-en-1-iliciclopropil]oxi}carbonil)-L-valinato de metilo (28 %) como un aceite. EM (ES+, m/z) 298 (M+H)<sup>+</sup>.

5

Etapa 5: 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-iliciclopropil]oxi}carbonil)-L-valina

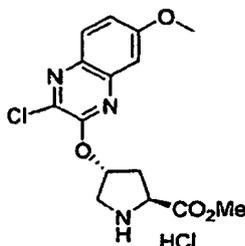


Una solución (0,1 M) de 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-iliciclopropil]oxi}carbonil)-L-valinato de metilo en una mezcla de 2:1 de MeOH/H<sub>2</sub>O se trató con LiOH·H<sub>2</sub>O (4 eq) y después se calentó a 60 °C durante 4 horas. La mezcla se enfrió y se concentró hasta la mitad del volumen, después se diluyó con EtOAc y se acidificó con HCl acuoso (1N). La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera y se secó. La eliminación de los volátiles dio el compuesto del título (98 %) en forma de un aceite. EM (ES+, m/z) 284 (M+H)<sup>+</sup>.

15

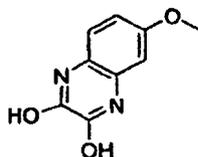
### Compuestos Intermedios C

Compuesto Intermedio C1: (4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalina-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo, clorhidrato



20

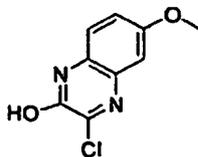
Etapa 1: 6-metoxiquinoxalina-2,3-diol



25

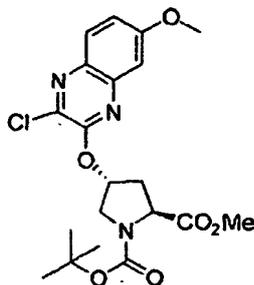
Una suspensión de diclorhidrato de 4-metoxibenceno-1,2-diamina en oxalato de dietilo (8 eq) se trató con Et<sub>3</sub>N (2 eq) y después se calentó a 150 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió y se filtró, después se recogió el sólido y se lavó con H<sub>2</sub>O y EtOH. El residuo se secó para proporcionar el compuesto del título (69 %). EM (ES+, m/z) 193 (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 2: 3-cloro-6-metoxiquinoxalina-2-ol

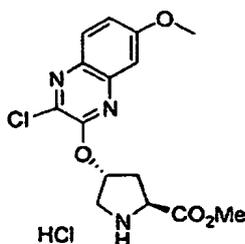


Una solución (1,53 M) de 6-metoxiquinoxalina-2,3-diol en DMF se trató con SOCl<sub>2</sub> (1 eq) y se calentó a 110 °C. Tras 1,5 h, la mezcla de reacción se enfrió y se vertió en HCl acuoso (1 N). El precipitado resultante se filtró y se lavó con H<sub>2</sub>O y Et<sub>2</sub>O. El sólido seco contenía predominantemente el compuesto del título como una mezcla con 6-metoxiquinoxalina-2,3-diol y 2,2-dicloro-6-metoxiquinoxalina. Este material se usó directamente en la etapa siguiente. EM (ES+, m/z) 211 (M+H)<sup>+</sup>.

40

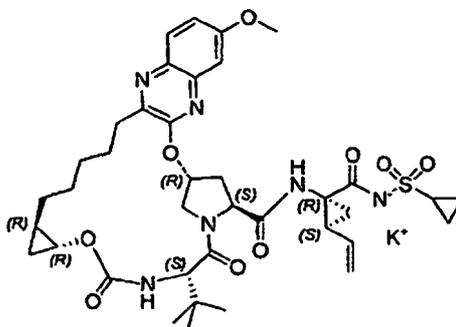
Etapa 3: 2-metil (2S,4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 1-terc-butilo

- 5 Una solución (0,35 M) de 3-cloro-6-metoxiquinoxalina-2-ol en NMP se trató con Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 eq) y 2-metil (2S,4S)-4-  
 10 {{{(4-bromofenil)sulfonil]oxi]pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 1-terc-butilo (1,1 eq). La mezcla resultante se agitó a 50 °C  
 durante 18 horas, después se añadió una porción (0,1 eq) de 2-metil (2S,4S)-4-{{{(4-bromofenil)sulfonil]oxi]pirrolidina-  
 1,2-dicarboxilato de 1-terc-butilo. Después de agitar durante 2 horas, la mezcla se enfrió y se diluyó con H<sub>2</sub>O y  
 EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl (1 N) acuoso, NaHCO<sub>3</sub> saturado acuoso y salmuera. La  
 fase orgánica seca se concentró hasta un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 0-6  
 % EtOAc/éter de petróleo para dar el compuesto del título (35 %) como sólido. EM (ES+, m/z) 438 (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 4: (4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo, clorhidrato

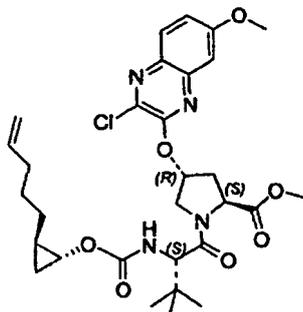
- 15 Una solución de (0,62 M) de 2-metil (2S,4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]pirrolidina-1,2-dicarboxilato de 1-  
 20 terc-butilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se trató con una solución (4 M) de HCl en dioxano (5 eq). La mezcla se agitó a 0 °C durante 2  
 horas y se trató con una solución (4 M) de HCl en (2 eq). Tras 5 horas, la reacción se juzgó completa y la mezcla se  
 concentró a presión reducida. El residuo se trituró con Et<sub>2</sub>O, para proporcionar el compuesto del título (95 %) como  
 un sólido. EM (ES+, m/z) 338 (M+H)<sup>+</sup>.

25 **Ejemplo 1: {{{(1R,2S)-1-(((1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a, 3,4,5,6, 9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanocicloprona [18,19][1,10,3,6] dioxadiazaciclonona- decino [11,12-b]quinoxalin-8-il)carbonil]amino)-2-vinilciclopropil]carbonil}(ciclopropilsulfonil) azanida de potasio**



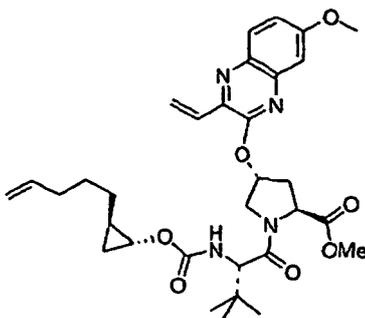
30

Etapa 1: 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valil-(4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo



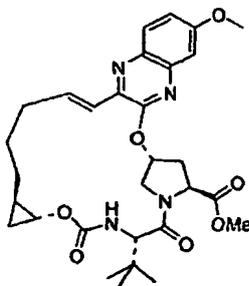
- 5 Una solución (0,2 M) (4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato clorhidrato de metilo (se trató con 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valina (1,1 eq), DIEA (5 eq) y HATU (1,2 eq). La mezcla resultante se agitó a 0-5 °C durante 5 h y se diluyó con EtOAc. La capa orgánica se separó y se lavó con HCl (1 N) acuoso, NaHCO<sub>3</sub> saturado acuoso y salmuera. La capa orgánica seca se concentró a presión reducida para dar un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 10-30 % EtOAc/éter de petróleo) para dar el compuesto del título (96 %) como un aceite. EM (ES<sup>+</sup>), *m/z* 604 (M+H)<sup>+</sup>.
- 10

Etapa 2: 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valil-(4R)-4-[(7-metoxi-3-vinilquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo



- 15 Una solución (0,1 M) 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valil-(4R)-4-[(3-cloro-7-metoxiquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo en EtOH se trató con trifluoruro(vinil)borato de potasio (1,5 eq) y trietilamina (1,5 eq). La mezcla resultante se desgasificó, después se añadió el aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,1 eq). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora, después se enfrió hasta la temperatura ambiente con H<sub>2</sub>O y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y salmuera, después se secó. La eliminación de los volátiles dio un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 20-30 % EtOAc/éter de petróleo) para dar el compuesto del título como una espuma amarilla que se usó directamente en la etapa siguiente. EM (ES<sup>+</sup>), *m/z* 595 (M+H)<sup>+</sup>.
- 20
- 25

Etapa 3: (1aR,5S,8S,10R,18E,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-dodecahidro-8H-7,10-metanociclopropa[18,19][1,10,3,6]dioxadiaziclononadecino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxilato de metilo

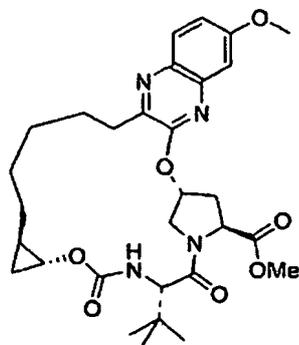


- 30 Una solución (0,02 M) 3-metil-N-(((1R,2R)-2-pent-4-en-1-ilciclopropil]oxi)carbonil)-L-valil-(4R)-4-[(7-metoxi-3-vinilquinoxalin-2-il)oxi]-L-prolinato de metilo en DCE se calentó hasta 80 °C y después se trató con catalizador Zhan1 (0,15 eq). La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 1 h y después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 20-50 % EtOAc/éter de petróleo) para dar el compuesto del título (25 % para 2 etapas) como una espuma. EM (ES<sup>+</sup>),
- 35

$m/z$  567 (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 4: (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopropa[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono-decino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxilato de metilo

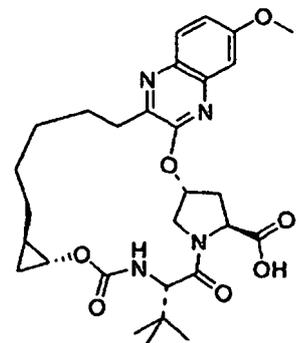
5



Una solución (0,05 M) de (1aR,5S,8S,10R,18E,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-dodecahidro-8H-7,10-metanociclopro-na[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono-decino[1,12-b]quinoxalin-8-carboxilato de metilo en MeOH/dioxano (proporción 1:1) se trató con Pd/C (8 % en peso). La mezcla resultante se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. El catalizador se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida, para dar el compuesto del título (98 %) como un sólido. EM (ES<sup>+</sup>)  $m/z$  569 (M+H)<sup>+</sup>.

Etapa 5: Ácido (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-1,4-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopropa[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono-decino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxílico

15



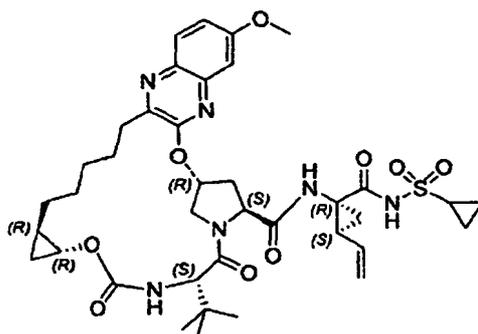
Una solución (0,1 M) de (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopro-na[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono-decino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxilato de metilo en una mezcla 1:1 de H<sub>2</sub>O/THF se trató con LiOH·H<sub>2</sub>O (3 eq). La mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 18 h, se acidificó con HCl acuoso (0,2 M) y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl acuoso (0,2 M) y salmuera, después se secó. La eliminación de los volátiles dio el compuesto del título (98 %) en forma de un sólido. EM (ES<sup>+</sup>)  $m/z$  555 (M+H)<sup>+</sup>.

20

25

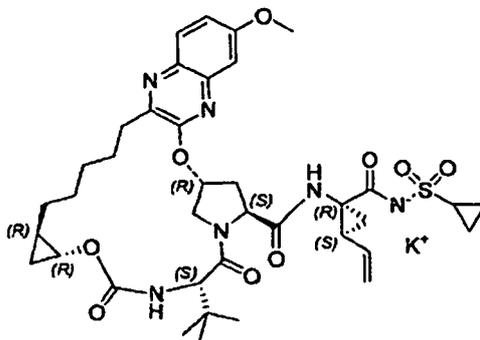
Etapa 6: (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-N-((1R,2S)-1-((ciclopropilsulfonil)amino)carboxil)-2-vinilciclopropil)-1,4-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopro-na[18,19][1,10,3,6]dioxadiazaciclono-decino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxamida

30



Una solución (0,1 M) de ácido (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a, 3,4,5,6, 9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopropana[18,19][1,10,3,6]dioxadiazacilonona-decino[11,12-b]quinoxalin-8-carboxílico en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se trató con cloruro de (1R,2S)-1-[[[ciclopropilsulfonil]amino]carbonil]-2-vinilciclopropanamino (1,3 eq), DIEA (3 eq), DMAP (1,5 eq) y TBTU (1.45 eq). La mezcla resultante se agitó a 0-5 °C durante 18 h y se diluyó con EtOAc.. Las solución se lavó HCl (0,2 M) acuoso, NaHCO<sub>3</sub> saturado acuoso y salmuera. Las fases orgánicas se secaron y se concentraron hasta dar un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente 2,5 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar el compuesto del título (89 %) como sólido. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) δ 172,32, 170,63, 169,04, 159,86, 156,95, 154,74, 148,10, 140,41, 133,55 (2 señales), 128,94, 118,21, 117,58, 105,89, 74,88, 59,75, 58,71, 55,68, 54,13, 54,01, 40,13, 34,49, 34,04, 33,76, 32,68, 30,71, 30,43, 28,55, 27,69, 27,28, 26,38, 21,98, 18,49, 10,67, 5,69, 5,46; MS (ES<sup>+</sup>) m/z 767 (M<sup>+</sup>H)].

Etapa 7: ((1R,2S)-1-(((1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-terc-butil-14-metoxi-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahidro-8H-7,10-metanociclopropana[18,19][1,10,3,6]dioxadiazacilonona-decino[11,12-b]quinoxalin-8-il)carbonil)amino)-2-vinilciclopropil]carbonil)(ciclopropilsulfonil) azanida de potasio



El material anterior se suspendió en EtOH y la solución resultante (0,025 M) se enfrió hasta 0 °C. Se añadió una solución (0,02 M) de terc-BuOK (1,5 eq) en EtOH, dando la formación de un precipitado. La mezcla se agitó a 20 °C durante 18 h y se recogió el sólido mediante filtración.. Este material se lavó con EtOH y se secó para dar el compuesto del título (93 %) en forma de un sólido cristalino. EM (ES<sup>+</sup>) m/z 767 (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 2: Comparación de diferentes compuestos

El compuesto del Ejemplo 1, se comparó con el compuesto de los Ejemplos 110 y 118 del documento WO 2008/057209. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación. Como se ilustra en las tablas y el debate de los resultados, el compuesto de fórmula (I) parece tener varias propiedades ventajosas en comparación con el compuesto del Ejemplo 118 del documento WO 2008/057209 y el compuesto del Ejemplo 110 del documento WO 2008/057209.

**Tabla 1**

	Ejemplo 118 del Documento WO 2008/057209	Ejemplo 1	Ejemplo 110 del Documento WO 2008/057209
Estructura			
Actividad inhibidora de NS 3/4A (K <sub>i</sub> ) 1b	< 0,016 nM	< 0,016 nM	< 0,016 nM
Actividad del replicón <sup>2</sup> CE <sub>50</sub> gt1b	3 nM	2 nM	5 nM
AUC en plasma de rata a 25 mpk por vía oral <sup>3</sup>	38,5 μM.h	20,6 μM.h	5,8 μM.h

Concentración en hígado de rata a 24 h (25 mpk por vía oral) <sup>3</sup>	18,4 µM	27,9 µM	8,5 µM
AUC en plasma de perro a 5mpk por vía oral <sup>3</sup>	10,9 µM.h	48,6 µM.h	1,0 µM.h
Concentración en hígado de perro a 24 h (5 mpk por vía oral) <sup>3</sup>	No disponible	120 µM	3,3 µM
Unión proteica covalente In Vivo <sup>4</sup>	Rat a 6 h plasma = BLQ, hígado = 30±3 pmol/mg de proteína	Rata a 6 h plasma = LOQ, hígado LOQ	Rata a 6 h plasma = BLQ hígado = BLQ
Propiedades físicas <sup>5</sup>	La sal de potasio no se desproporciona en solución.	La sal de potasio no se desproporciona en solución.	La sal de potasio se desproporciona en la forma neutra cristalina en solución.
<p>Ki : Constante de inhibición, referencia a &lt; 0,016 nM indica que la actividad observada es menor de 0,016 nM, la cantidad exacta menor de 0,016 nM no se determinó en el ensayo; CE50: Concentración Efectiva que alcanza un 50 % de supresión de la replicación viral; gt: Genotipo, AUC: Área bajo la curva de la concentración plasmática tiempo; LOQ: Límite de cuantificación 3 pmol/mg); BLQ: Por debajo del límite de cuantificación.</p>			

*Compuesto de fórmula (I) comparado con el Ejemplo 110 del documento WO 2008/057209*

5 Las propiedades ventajosas del compuesto de fórmula (I) frente al compuesto del Ejemplo 110 del documento WO 2008/057209 son las siguientes:

- 1) Propiedades físicas (no hay desproporción de sal para el Compuesto de fórmula (I));
- 2) Perfil farmacocinético en ratas tras la administración de la sal de potasio; y
- 3) Exposición del hígado (órgano diana).

10 Las diferencias en las propiedades son particularmente ventajosas para la formulación y administración del compuesto de fórmula (I) frente al compuesto del Ejemplo 110 del documento WO 2008/057209. La falta de desproporción de la sal para del compuesto de fórmula (I) permite la disolución de 1,8 mg/ml de la forma de sal de K<sup>+</sup> del compuesto del Ejemplo 1 en agua. Aunque la de sal de K<sup>+</sup> del compuesto del Ejemplo 110 del documento

15 WO 2008/057209 ha mejorado la solubilidad acuosa (9,7 mg/ml), el compuesto disuelto de este modo se desproporciona para dar la forma zwitteriónica cristalina que tiene una solubilidad acuosa baja (<0,009 mg/ml). La ausencia de este comportamiento para el compuesto del Ejemplo 1 proporciona una ventaja inesperada en su formulación para la administración farmacéutica y tiene como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas como se indica en la Tabla 1 (AUC en plasma y exposición del hígado para ratas y perros). La elevada exposición en

20 plasma e hígado en especies preclínicas es ventajosa para la selección de dosis seguras y eficaces para usar en el tratamiento de pacientes.

*Compuesto de fórmula (I) comparado con el Ejemplo 118 del documento WO 2008/057209*

25 Una ventaja observada del compuesto de fórmula (I) en comparación con el Ejemplo 118 del documento WO2008/057209 es su perfil de resistencia contra diferentes mutantes enzimáticos. Compatible con los datos de los estudios clínicos con agentes antivirales de clases relacionadas (p. ej., inhibidores de la proteasa del VH) y también de estudios con inhibidores de la proteasa NS3 de VHC (p. ej., VX-950, telaprevir), cabe esperar que se pueda desarrollar resistencia viral en respuesta al tratamiento con estos compuestos. El compuesto del Ejemplo 1 mostró

30 mejor afinidad enzimática (K<sub>i</sub>) contra diferentes mutantes enzimáticos conocidos que se sabe que confieren resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 de VHC. En la Tabla 2 se resume la actividad contra diferentes mutantes enzimáticos. Por tanto, una ventaja del compuesto 2 puede ser un incremento de la barrera al desarrollo de virus resistentes cuando se administra a pacientes. También proporciona la posible ventaja de tratar pacientes en los que han fracasado otras terapias por el desarrollo de resistencia, ya que el compuesto 1 puede inhibir este virus

35 resistente.

Tabla 2 Valores de  $K_i^1$  frente a mutante enzimático 1b (nM)

1b SHIFT	D168T	D168A	D168E	D168G	D168V	D168Y	D168Q
Ejemplo 1	0,18	0,43	0,04	0,08	0,14	0,22	0,12
cmp 118	0,78	0,86	0,12	0,45	0,65	1,5	0,42
1b SHIFT	A156S	A156T	A156V	R155K	R155Q	R155G	R155N
Ejemplo 1	0,05	5,2	11	0,07	0,43	0,63	0,13
cmp 118	0,1	3,4	15	0,08	1,9	2,3	0,56

<sup>1</sup>Datos comparativos recogidos del mismo ciclo de los ensayos enzimáticos.

Otras propiedades ventajosas esperadas del compuesto de fórmula (I) frente al compuesto del Ejemplo 110 del documento WO 2008/057209 son las siguientes:

5

- 1) Baja unión covalente *in vivo*; y
- 2) Elevada exposición en plasma e hígado.

10

Se encontró que el compuesto de fórmula (I) tiene características de unión covalente y propiedades farmacocinéticas muy buenas. Basándose en la unión covalente observada *in vivo* y a las propiedades farmacocinéticas del compuesto del ejemplo 1 y del compuesto del ejemplo 118 del documento WO 2008/057209, el compuesto de fórmula (I) tiene características de unión covalente y propiedades farmacocinéticas *in vivo* significativamente mejores.

15

Los compuestos que se unen covalentemente a proteínas, o que forman metabolitos que después se unen covalentemente a proteínas, dan lugar a acontecimientos adversos en pacientes, tales como toxicidades inmunológicas mediadas por las respuestas de anticuerpos al conjugado fármaco-proteína, y otras toxicidades idiosincrásicas. (Véase Chem. Res. Toxicol. 2004, 17, 3-16).

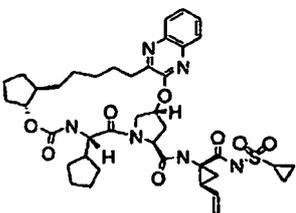
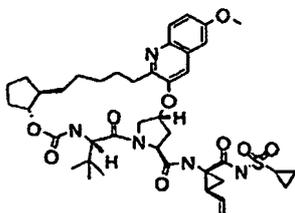
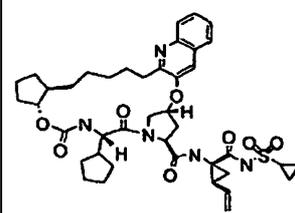
20

El compuesto del Ejemplo 1 mostró una unión indetectable a las proteínas en plasma tras la administración oral de una única dosis de 20 mg/kg a ratas. (Véase la Tabla 1). En condiciones análogas, el compuesto del Ejemplo 118 del documento WO 2008/057209 demostró unión detectable a las proteínas del hígado de rata (véase la Tabla 1) y, por tanto, se puede considerar un compuesto menos ventajoso para la administración a sujetos humanos que el compuesto de fórmula (I).

25

La Tabla 3 proporciona algunos datos de unión covalente *in vivo* observados para compuestos relacionados del documento WO 2008/057209 que contienen el resto (R,R)-trans-2-alquiciclopentanol incorporado en el Ejemplo 118.

Tabla 3

	Ejemplo 108 del Documento WO 2008/057209	Ejemplo 103 del Documento WO 2008/057209	Ejemplo 96 del Documento WO 2008/057209
Estructura			
Unión proteica covalente <i>In Vivo</i> <sup>4</sup>	Plasma de rata a 6h = 15 pmol eq./mg hígado = 38 pmol eq/mg	Plasma de rata a 6h = 6 pmol eq./mg hígado = 24 pmol eq/mg	Plasma de rata a 6h = 6 pmol eq./mg Hígado = 63 pmol eq/mg

30

Es ventajoso tener una elevada exposición en plasma e hígado en especies preclínicas para demostrar con eficacia que el potencial candidato a fármaco no provoca toxicidades indeseadas. También es más probable que un compuesto que tiene una elevada exposición en hígado y plasma en animales muestra el mismo comportamiento en el ser humano que uno que no. Para dicho compuesto, la exposición eficaz requerida en el ser humano se puede alcanzar con una dosis menor, ambas ventajosas para los costes y la facilidad de fabricación del fármaco, pero que también disminuye potencialmente la probabilidad de efectos adversos. La exposición en el órgano diana en múltiples especies preclínicas proporciona un fundamento de que la exposición elevada en el órgano diana se puede conseguir para el compuesto en pacientes y que una elevada exposición en hígado en perros y en ratas permite una

35

evaluación fiable de la toxicidad preclínica. La elevada exposición en hígado es especialmente ventajosa para el VHC, ya que este es el órgano diana para el fármaco.

El compuesto del Ejemplo 1 tenía una muy buena exposición en hígado y en plasma de rata. La exposición en hígado de rata observada fue a un nivel mayor que el compuesto 118 y el compuesto 110 del documento WO 2008/057209 (véase la Tabla 1). Basándose en estos resultados y a los ensayos de diferentes compuestos del documento WO 2008/057209 mediante administración oral a ratas ((25mpk) y a perros (5mpk), también cabe esperar que el compuesto de fórmula (I) tenga exposiciones en hígado de perro superiores a las del compuesto 118 y el compuesto 110 del documento WO 2008/057209.

## Métodos

Actividad inhibidora de NS 3/4A<sup>1</sup> (K): La actividad inhibidora de NS 3/4A se determinó como se describe en la Sección IV. Evaluación Del compuesto ant. y Mao et al., Anal Biochem 373:1-8, 2008.

Actividad del replicón<sup>2</sup> CE<sub>50</sub>: La actividad del replicón se determinó usando los procedimientos descritos en Carroll et al., J. Biol. Chem. 278:11979-11984, 2003 y Olsen et al., Anti Microb. Agents 48:3944-3953, 2004.

AUC en plasma de rata a 25mpk por vía oral<sup>3</sup>: Los compuestos de ensayo se disolvieron en un vehículo de dosificación adecuado para la administración iv (p. ej., 20 %:60 %:20% DMSO:PEG400:Agua) o administración por vía oral (p. ej., POLISORBATO 80 al 10 %: 90 % de agua o 100 % de PEG400). La administración en los animales (n = 3) se realizó usando un diseño de estudio cruzado para no roedores. Las muestras de plasma se recogieron en los puntos de tiempo entre 2 minutos y 24 horas y los niveles del compuesto se determinaron mediante RP-HPLC. Las muestras de hígado se recogieron post mortem en las ratas y tras anestesia (0,5 h antes de la biopsia) en perros. Las muestras de hígado se pesaron, homogeneizaron y diluyeron usando técnicas conocidas por los expertos y los niveles del compuesto se determinaron mediante RP-HPLC.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon basándose en análisis no compartimentales (p. ej., usando WATSON®, WINNOLIN®). A las concentraciones predosis inferiores al límite de cuantificación (BLQ) se les asignó un valor de 0. Para la estimación de la AUC oral, al primer valor de BL1 en la fase terminal se le proporcionó un valor igual a ½ el límite menor de cuantificación, mientras que a los siguientes valores en la fase terminal se les asignó un valor de 0. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos estándar, CLp, Vdss, vida media (solo para IV), % F, C<sub>máx</sub>, T<sub>máx</sub>, AUC<sub>0-last</sub>, AUC<sub>0-infinito</sub>. Los valores de ACU se calcularon usando el procedimiento trapezoidal lineal para concentraciones ascendentes y el procedimiento trapezoidal log para las concentraciones descendentes.

Unión covalente in vivo<sup>4</sup>: Los compuestos de ensayo se radiomarcaron covalentemente (3H) y se preparó una dosis de 20 mg/kg que contiene 25 - 75 mCi/rata (pureza >98,5 %) mediante combinación del compuesto frío y solución madre de rastreo marcada evaporada. Esta mezcla se disolvió en un vehículo de dosificación adecuado para administración por vía oral (véase anteriormente), después administrar oralmente a las ratas (n = 3 por punto de tiempo, 2h, 6h, 24h). Se obtuvieron plasma e hígados y se ultracongelaron/almacenaron a -80 °C antes del análisis.

Recuento de las muestras de plasma: Colocar un alícuota de 200 µl en un vial de centelleo de 20 ml. Añadir 500 µl en de SOLVABLE™ e incubar durante 1 h con agitación a 55 °C. Eliminar, dejar enfriar antes de la adición a un cóctel de 15 ml de centelleo y contar. Las muestras de plasma (alícuota de 200 µl) se procesaron después como se describe a continuación para las proteínas hepáticas.

Homogeneización de los tejidos: Las muestras de hígado pesadas se diluyeron con 2 vol de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) y se homogeneizaron en hielo.

Recuento del homogeneizado hepático: Los alícuotas se colocaron en un vial de centelleo de 20 ml, se diluyó con 1 ml de SOLVABLE™ y se incubó durante 1 h con agitación a 55 °C. Tras la extracción del incubador y enfriar se añadieron 15 ml de cóctel de centelleo y 20 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se contó la radioactividad.

Precipitación de proteínas: Tomar un alícuota de 500 µl, añadir 1:8 de homogeneizado:acetoneitrilo (si se sospecha que el compuesto tiene una solubilidad baja en acetoneitrilo, se puede seleccionar otro disolvente), agitar en vórtex y centrifugar (3500 rpm durante 29 minutos). Descartar el sobrenadante.

Resuspensión del precipitado proteico: Sonicación (intensidad mínima, < 5 s) y agitar en vórtex hasta triturar el sedimento en 80 % de MeOH:20 % de agua.

Lavado del sedimento proteico: 2-5 ml 80:20 MeOH: agua Si es necesario, retirar 1,0 ml del sobrenadante, añadir 15 ml de cóctel de centelleo y contar. Seguir lavando el sedimento proteico hasta que la radioactividad en el sobrenadante es < 200 DPM o DPM deja de disminuir en más de 200 en lavados consecutivos.

Disolución del sedimento final: 1 ml de NaOH 1 N o SOLVABLE™, se incubó a 50 °C durante la noche o hasta que se disolvió por completo.

*Recuento del sedimento final:* 1 ml del sedimento final, 10 ml de cóctel de centelleo (si se usa otro cóctel de centelleo distinto a ULTIMA GOLD™, puede ser necesario neutralizar usando HCl 1N), y contar.

5 *Concentración proteica del sedimento final:* BCA o BIO-RAD K<sub>t</sub> usando BSA como patrón.

*Recuento de muestras blanco:* 15 ml de cóctel de centelleo por duplicado.

*Recuento de la solución de dosificación:* Contar un volumen conocido de la solución de dosificación por triplicado.

10 *Análisis de Datos:* Realizar la media de los recuentos de radioactividad (DPM) en la solución de dosificación y calcular la actividad específica de la solución de dosificación en  $\mu\text{Ci/mol}$ . Realizar la media de los recuentos de radioactividad de las muestras blanco. Restar los recuentos de la muestra blanco promedio de los recuentos obtenidos de cada sedimento en hígado y plasma, Calcular la cantidad de radioactividad ( $\mu\text{Ci}$ ) por unidad de volumen (l) para cada sedimento en hígado y plasma. Calcular la concentración de radioactividad en cada sedimento en hígado y plasma dividiendo el valor obtenido anteriormente ( $\mu\text{Ci}$ ) por la actividad específica ( $\mu\text{Ci/mol}$ ). Calcular la cantidad de radioactividad unida covalentemente a la proteína en pmol/mg de proteína.

15 *Recuento de muestras blanco:* 15 ml de cóctel de centelleo por duplicado.

20 *Recuento de la solución de dosificación:* Contar un volumen conocido de la solución de dosificación por triplicado.

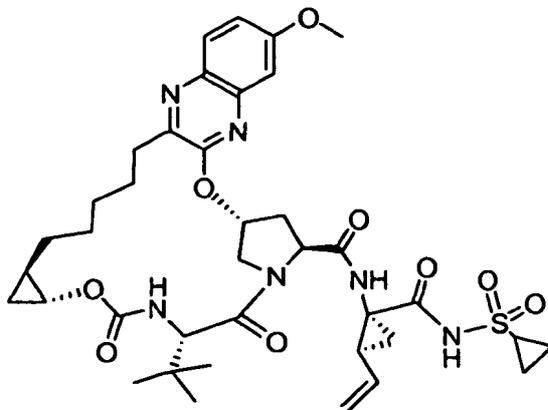
25 Propiedades físicas<sup>5</sup>: Los compuestos de ensayo cristalinos (sal de potasio, aprox. 5 mg) se pesaron en un vial de vidrio y se añadió agua o tampón acuoso (100  $\mu\text{l}$ ). La pasta obtenida se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de centrifugar, se analizó el sobrenadante mediante HPLC de fase inversa y se determinó la solubilidad en equilibrio mediante comparación con una curva de calibración. El material sólido se transfirió en parte a una placa XRPD, se secó y se analizó mediante difracción en polvo de rayos X. El patrón XRPD se comparó con los controles positivos para la sal de K<sup>+</sup> cristalina, formas zwitteriónicas (o ácidas) cristalinas y formas amorfas del compuesto de ensayo. Una demostración adicional de la forma en sal se obtuvo de una segunda porción del material sólido que se analizó mediante RMN de 400 MHz (Bruker) tras disolución en DMSO<sub>6</sub>. Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H se compararon con los controles positivos descritos anteriormente.

30 Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones. Aunque varias realizaciones se han mostrado y descrito, se pueden hacer diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la presente invención definida con las reivindicaciones.

35

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación de un compuesto de fórmula (I), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable:



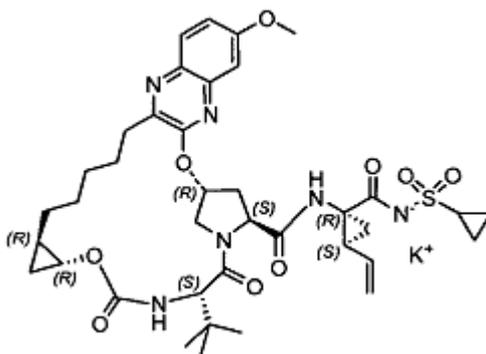
(I)

5

y uno o más agentes terapéuticos adicionales.

2. La combinación de la reivindicación 1 en la que el compuesto de fórmula (I) tiene la estructura:

10



3. La combinación de la reivindicación 1 en la que el agente terapéutico adicional se dirige al VCH o potencia el sistema inmune.

15

4. La combinación de la reivindicación 1 en la que el agente terapéutico que se dirige al VCH se dirige a las actividades de NS3, NS5A, NS5B o a las células huésped implicadas en la replicación del VCH.

5. La combinación de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4 en la que el agente terapéutico adicional es ribavirina, levovirina, viramidina, timosina alfa-1, interferón- $\beta$ , interferón- $\alpha$  o peginterferón- $\alpha$ .

20

6. La combinación de la reivindicación 5 en la que el agente terapéutico adicional es una combinación de interferón- $\alpha$  y ribavirina o una combinación de peginterferón- $\alpha$  y ribavirina.

25

7. La combinación de las reivindicaciones 1, 2 o 3 en la que el agente terapéutico adicional es el agente antiviral inhibidor de la polimerasa R7128.