(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 542 880**

(51) Int. Cl.:

C07D 207/16 (2006.01)
C07D 207/08 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2008** **E 08874317 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2274281**

(54) Título: **Inhibidores de la proteasa de HCV**

(30) Prioridad:

16.05.2008 US 53857

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2015

(73) Titular/es:

TAIGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
7F, 138 Shin Ming Rd. Neihu District
114 Taipei, TW

(72) Inventor/es:

LIN, CHU-CHUNG;
LEE, KUANG-YUAN;
LIU, YO-CHIN;
LO, PIN;
CHEN, RONG-JIUNN;
LIU, CHEN-FU;
CHEN, CHIH-MING y
KING, CHI-HSIN RICHARD

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 542 880 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la proteasa de HCV

Antecedentes

El virus de la hepatitis C (HCV), un virus de ARN monocatenario de hebra-(+), es el principal agente causal de la mayoría de los casos de hepatitis no A, no B. La infección por HCV es un problema urgente para la salud humana. Véase, por ejemplo, el documento WO 05/007681; documento WO 89/04669; documento EP 381216; Alberti et al., J. Hepatology, 31 (supl. 1), 17-24 (1999); Alter, J., Hepatology, 31 (supl. 1), 88-91 (1999); y Lavanchy, J. Viral Hepatitis, 6, 35-47 (1999).

La hepatitis provocada por una infección por HCV es difícil de tratar, puesto que el virus puede mutar con rapidez y escapar a la respuesta inmunológica natural. Las únicas terapias anti-HCV disponibles en la actualidad son el interferón-α, la combinación de interferón-α/ribavirina, y el interferón-α pegilado. Sin embargo, las tasas de respuesta sostenida para el interferón-α o para la combinación de interferón-α/ribavirina han demostrado ser <50%, y los pacientes sufren mucho por los efectos secundarios de estos agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, Walker, DDT, 4, 518-529 (1999); Weiland, FEMS Microbial. Rev., 14, 279-288 (1994); y el documento WO 02/18369. Por tanto, sigue siendo necesario desarrollar fármacos terapéuticos más eficaces y que se toleren mejor.

Una proteasa de HCV necesaria para la replicación vírica contiene aproximadamente 3000 aminoácidos. Incluye una proteína de la nucleocápsida (C), proteínas de la envuelta (E1 y E2), y varias proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS5a y NS5b).

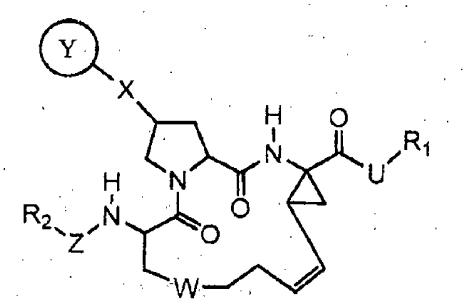
La proteína NS3 posee actividad serina proteasa y se considera fundamental para la replicación y la infectividad vírica. El carácter fundamental de la NS3 proteasa se ha inferido del hecho de que unas mutaciones en la NS3 proteasa del virus de la fiebre amarilla disminuyeron la infectividad vírica. Véase, por ejemplo, Chamber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898-8902 (1990). También se ha demostrado que unas mutaciones en el sitio activo de la NS3 proteasa de HCV inhiben completamente la infección por HCV en un modelo de chimpancé. Véase, por ejemplo, Rice et al., J. Virol., 74 (4), 2046-2051 (2000). Además, se ha descubierto que la NS3 proteasa de HCV facilita la proteolisis en las zonas de unión de NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a, NS5a/NS5b y que, por tanto, son responsables de generar cuatro proteínas víricas durante la replicación vírica. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0207861. Por consiguiente, la enzima NS3 proteasa de HCV es una diana atractiva para tratar la infección por HCV. Pueden encontrarse inhibidores de la NS3 proteasa de HCV en los documentos in WO 02/18369, WO 00/09558, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO 98/46630, WO 98/17679, WO 97/43310, US 5.990.276, Dunsdon et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 10, 1571-1579 (2000); Llinas-Brunet et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 10, 2267-2270 (2000); y S. LaPlante et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 10, 2271-2274 (2000).

Se ha indicado que ciertos compuestos macrocíclicos poseen actividad inhibidora de HCV. Por ejemplo, se han sintetizado inhibidores de la proteasa de HCV de arilalcoxilo. Véase la solicitud de patente internacional WO 2008022006. También se ha descubierto que ciertos compuestos de isoquinolina macrocíclicos inhiben al HCV. Véanse las solicitudes de patentes internacional WO 2004094452 y WO 2003053349.

Sumario

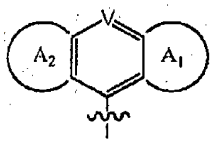
Esta invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ciertos compuestos macrocíclicos son eficaces para inhibir la actividad NS3 de HCV y los niveles de ARN de HCV.

En un aspecto, esta invención se refiere a los compuestos de fórmula (I):

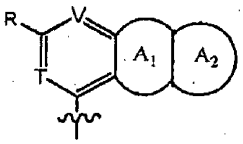


Fórmula (I)

en la que cada uno de R_1 y R_2, independientemente, es H, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; U es -O-, -NH-, -NH(CO)-, -NHSO-, o $-NHSO_2-$; W es $-(CH_2)_m-$, $-NH(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH-$, $-O(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nO-$, $-S(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nS-$, -SO-, $-SO(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nSO-$, $-SO_2(CH_2)_n-$, o $-(CH_2)_nSO_2-$, y m es 1, 2, o 3, y n es 0, 1, o 2; X is -O-; Y es

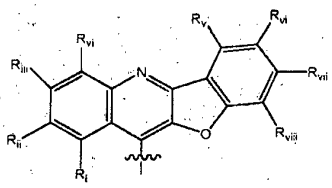
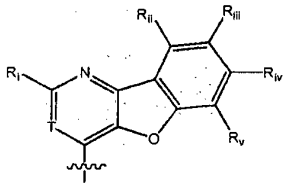
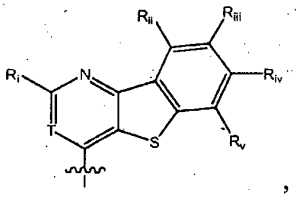


o



en las que cada uno de V y T, independientemente, es -CH- o -N-; R es H, halógeno, nitro, ciano, amino, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; y cada uno de A_1 y A_2, independientemente, es cicloalquilo C_{4-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con halógeno, nitro, ciano, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, arilo, o heteroarilo; o está opcionalmente condensado con otro cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con halógeno, nitro, ciano, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; y Z es -C(O), -OC(O)-, -NR'C(O)-, -OC(S)-, -NR'-C(S)-, o -OC(NH)-; en los que R' es H, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo. Por supuesto, los grupos asignados a las variables U, W, X, y Z son bivalentes. Cada uno de los grupos se presenta arriba en la misma orientación en la que se presenta la variable a la cual están asignados. Por ejemplo, el grupo -NHSO- asignado a la variable U, que, tal como se muestra en la fórmula, está interpuesto entre C=O y R_1: el átomo de N en este -NHSO- está unido a C=O, y el átomo de S está unido a R_1.

Con respecto a la fórmula (I), un subconjunto de los compuestos descritos anteriormente son los que presentan una de las siguientes características: R_1 es ciclopropilo; R_2 es alquilo C_{1-5} o cicloalquilo C_{3-8}; W es $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$, o $-SOCH_2-$; U es $-NHSO_2-$; Z es -OC(O)-; X es O; e Y es


,

, o

,

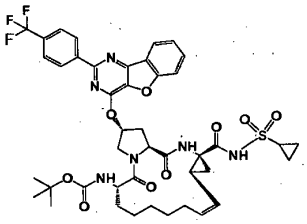
en las que cada uno de R_i, R_{ii}, R_{iii}, R_{iv}, R_v, R_{vi}, R_{vii}, y R_{viii} es, independientemente, H, halógeno, nitro, ciano, amino, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo.

El término “alquilo” se refiere a un resto hidrocarbonado saturado, lineal o ramificado, tal como $-CH_3$ o $-CH(CH_3)_2$. El término “alcoxi” se refiere a un radical -O-(alquilo C_{1-6}). El término "alquenilo" se refiere a un resto hidrocarbonato lineal o ramificado que contiene al menos un doble enlace, tal como $-CH=CH-CH_3$. El término "alquinilo" se refiere a un resto hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene al menos un triple enlace, tal como $-C\equiv C- CH_3$. El término “cicloalquilo” se refiere a un resto hidrocarbonado saturado cíclico, tal como ciclohexilo. El término “cicloalquenilo” se refiere a un resto hidrocarbonato no aromático cíclico que contiene al menos un doble enlace, tal como ciclohexenilo. El término “heterocicloalquilo” se refiere a un resto saturado cíclico que tiene al menos un heteroátomo en el anillo (por ejemplo, N, O o S), tal como 4-tetrahidropiranilo. El término “heterocicloalquenilo” se refiere a un resto no aromático cíclico que tiene al menos un heteroátomo en el anillo (por ejemplo, N, O o S), y al menos un doble enlace en el anillo, tal como piranilo. El término “arilo” se refiere a un resto hidrocarbonado que tiene uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de restos arilo incluyen fenilo (Ph), fenilleno, naftilo, naftileno, pirenilo, antrilo y fenantrilo. El término “heteroarilo” se refiere a un resto que tiene uno o más anillos aromáticos que contienen al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S). Los ejemplos de restos heteroarilo incluyen furilo, furileno, fluorenilo, pirrolilo, tienilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, piridilo, pirimidinilo, quinazolinilo, quinolilo, isoquinolilo e indolilo. El término "amino" se refiere a un radical $-NH_2$, -NH-(alquilo C_{1-6}), o -N(alquilo C_{1-6})$_2$.

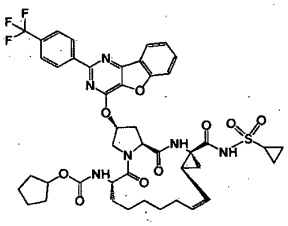
Los alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo mencionados en la presente incluyen restos sustituidos y no sustituidos, a menos que se especifique lo contrario. Los posibles sustituyentes sobre cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo incluyen, pero no se limitan a alquilo C_1-C_{10}, alquenilo C_2-C_{10}, alquinilo C_2-C_{10}, cicloalquilo C_3-C_{20}, cicloalquenilo C_3-C_{20}, heterocicloalquilo C_1-C_{20}, heterocicloalquenilo C_1-C_{20}, alcoxi C_1-C_{10}, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, alquilamino C_1-C_{10}, dialquilamino C_1-C_{20}, arilamino, diarilamino, alquilsulfonamino C_1-C_{10}, arilsulfonamino, alquilimino C_1-C_{10}, arilimino, alquilsulfonimino C_1-C_{10}, arilsulfonimino, hidroxilo, halógeno, tio,

alquiltio C_1-C_{10}, ariltio, alquilsulfonilo C_1-C_{10}, arilsulfonilo, acilamino, aminoacilo, aminotioacilo, amidino, guanidina, ureido, ciano, nitro, nitroso, azido, acilo, tioacilo, aciloxi, carboxilo, y éster carboxílico. Por otra parte, los posibles sustituyentes sobre alquilo, alquenilo, o alquinilo incluyen todos los sustituyentes indicados anteriormente, excepto alquilo C_1-C_{10}. Los cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo también pueden estar condensados entre sí.

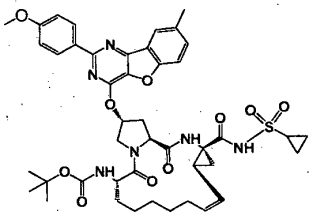
A continuación se muestran ejemplos de compuestos.



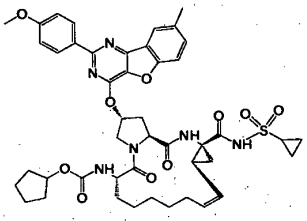
Compuesto 1



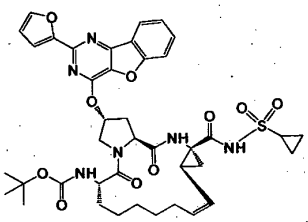
Compuesto 2



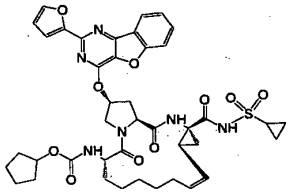
Compuesto 3



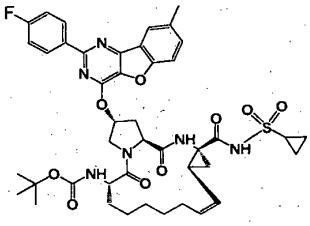
Compuesto 4



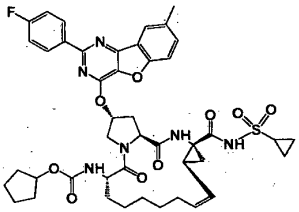
Compuesto 5



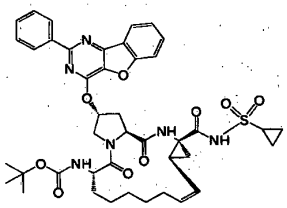
Compuesto 6



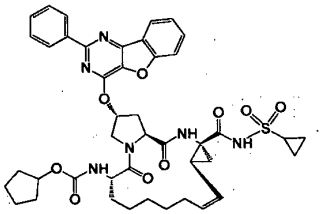
Compuesto 7



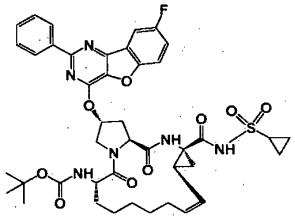
Compuesto 8



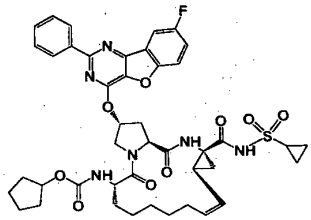
Compuesto 9



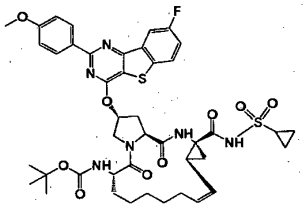
Compuesto 10



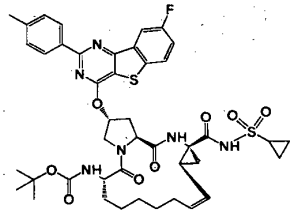
Compuesto 11



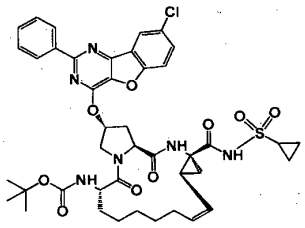
Compuesto 12



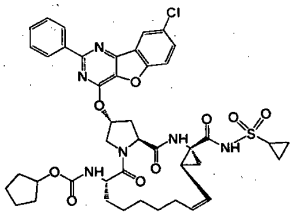
Compuesto 13



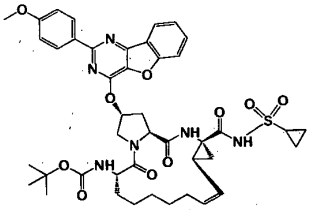
Compuesto 14



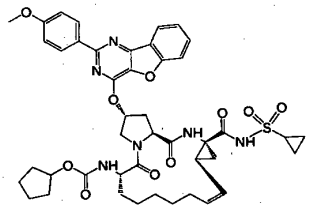
Compuesto 15



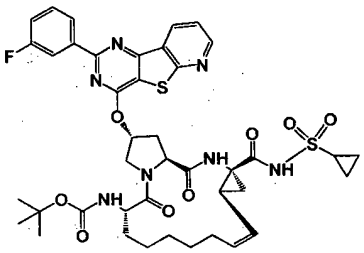
Compuesto 16



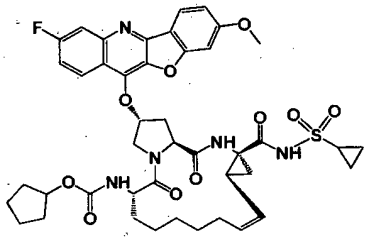
Compuesto 17



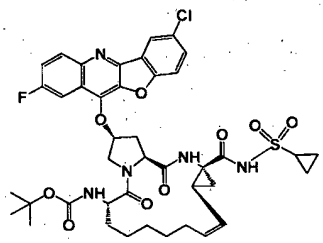
Compuesto 18



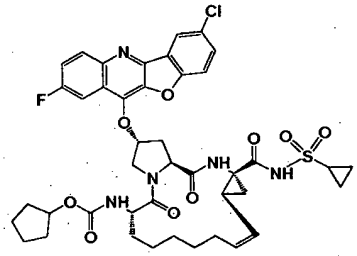
Compuesto 19



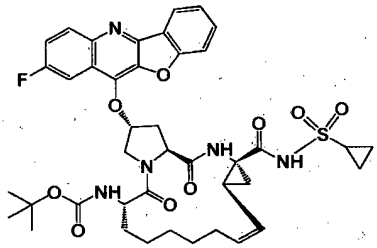
Compuesto 20



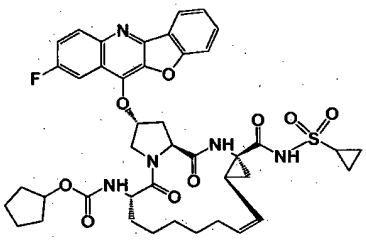
Compuesto 21



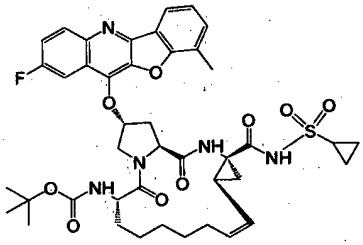
Compuesto 22



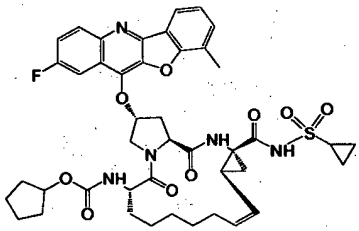
Compuesto 23



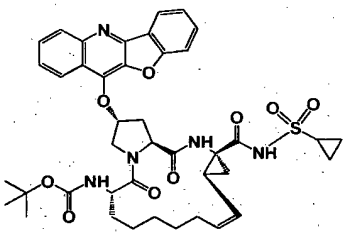
Compuesto 24



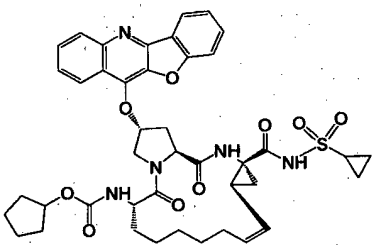
Compuesto 25



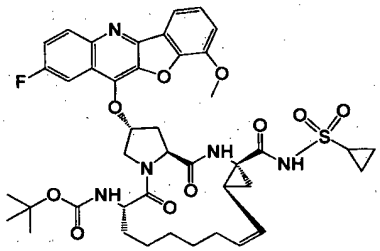
Compuesto 26



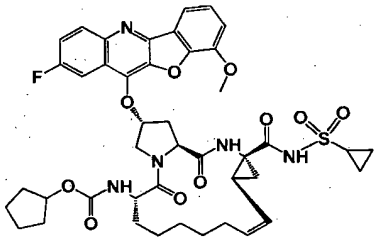
Compuesto 27



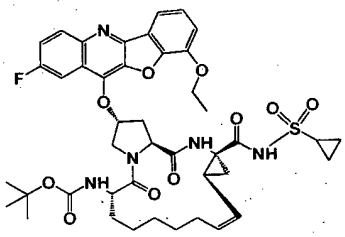
Compuesto 28



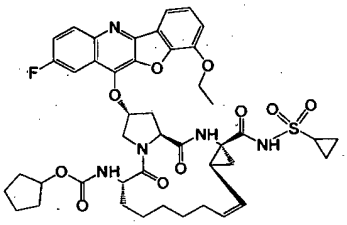
Compuesto 29



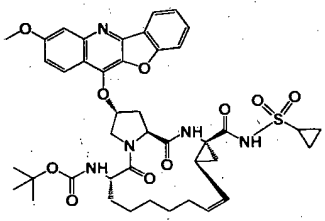
Compuesto 30



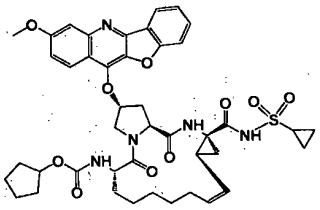
Compuesto 31



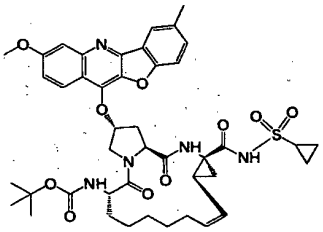
Compuesto 32



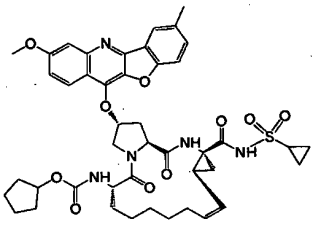
Compuesto 33



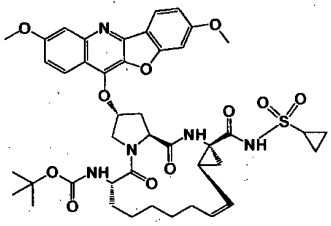
Compuesto 34



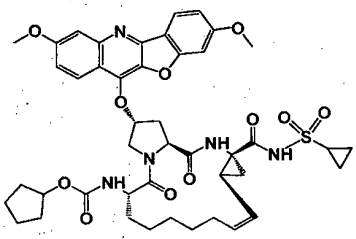
Compuesto 35



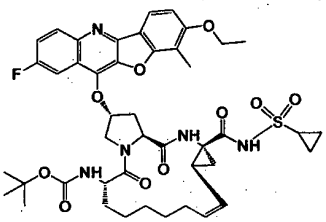
Compuesto 36



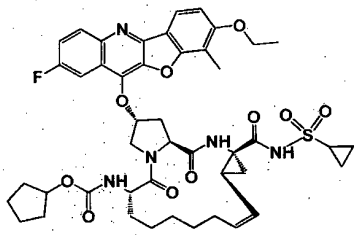
Compuesto 37



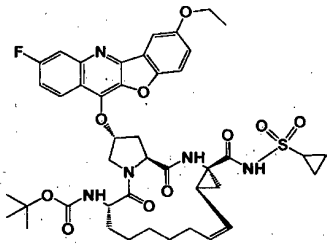
Compuesto 38



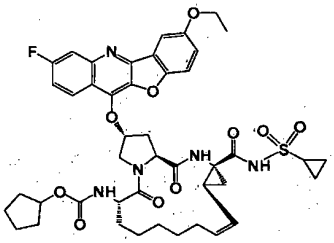
Compuesto 39



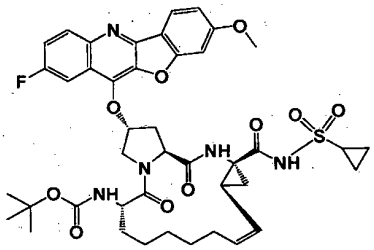
Compuesto 40



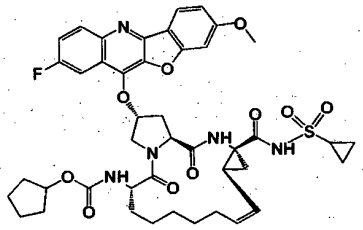
Compuesto 41



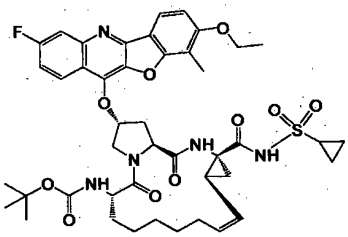
Compuesto 42



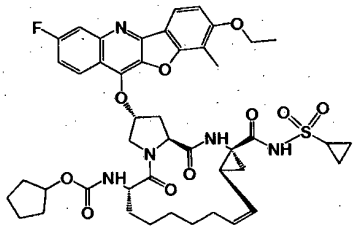
Compuesto 43



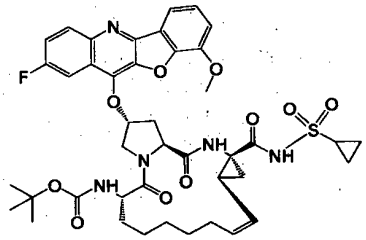
Compuesto 44



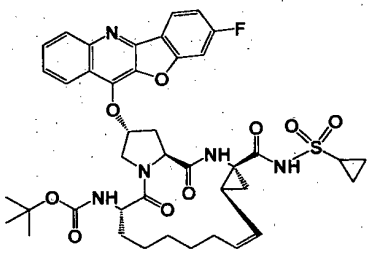
Compuesto 45



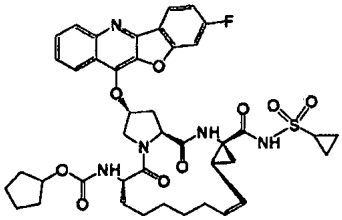
Compuesto 46



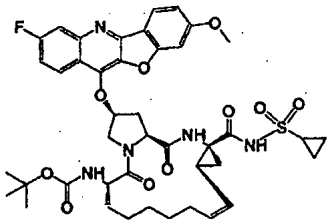
Compuesto 47



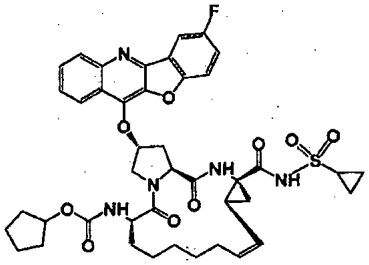
Compuesto 48



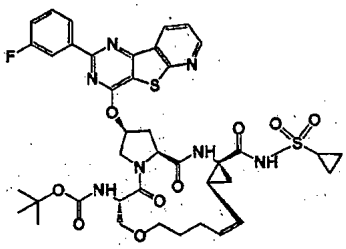
Compuesto 49



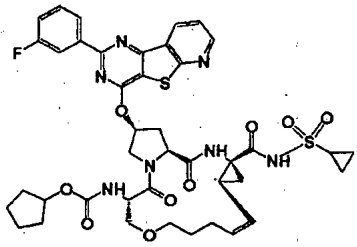
Compuesto 50



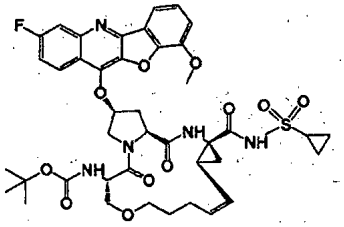
Compuesto 51



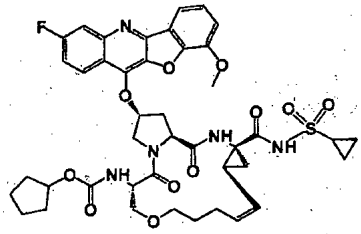
Compuesto 54



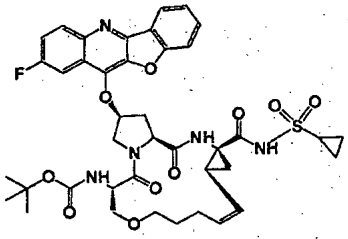
Compuesto 55



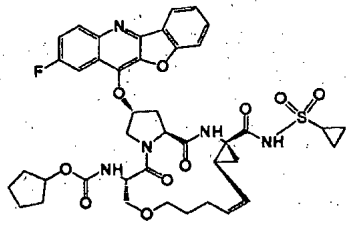
Compuesto 56



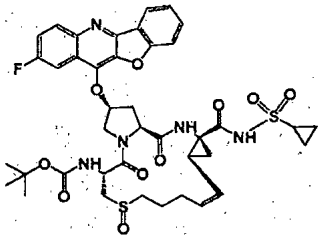
Compuesto 57



Compuesto 58



Compuesto 59



Compuesto 60

En otro aspecto, se describe un método para tratar una infección por el virus de la hepatitis C. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la fórmula (I) mostrada anteriormente.

En otro aspecto, esta invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso para tratar una infección por HCV. La composición contiene una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También puede incluir un inhibidor de una diana distinta de la NS3 proteasa de HCV en el ciclo de vida del HCV, por ejemplo, NS5B polimerasa, NS5A, NS4B, o p7. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero no se limitan a N-[3-(1-ciclobutilmetil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidro-quinolin-3-il)-1,1-dioxo-1,4-dihidro-116-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il]metansulfonamida (documento WO04041818), trans-1,2-di-4-[(fenilacetilpirrolidin-2-(S)-carbonil)amino]feniletileno (documento WO0401413), y 1-aminoadamantano (Amentadine, Griffm, 2004, J. Gen. Virol., 85: p. 451). La composición farmacéutica puede contener también un agente inmunomodulador o un segundo agente antivírico. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a Nov-205 (Novelos Therapeutics Inc., documento WO02076490) e IMO-2125 (Idera Pharmaceuticals Inc., documento WO05001055). Un agente antivírico se refiere a un agente activo que mata a un virus o reprime su replicación. Los ejemplos de agentes antivíricos incluyen, pero no se limitan a ribavirina, α-interferón, interferón pegilado, e inhibidores de proteasas de HCV, tales como (1-ciclopropilaminooxalilbutil)amida del ácido 2-(2-{2-ciclohexil-2-[(pirazin-2-carbonil)amino]acetilamino}-3,3-dimetilbutiril)octahidro-ciclopenta[c]pirrol-1-carboxílico (Telaprevir, Vertex

Pharmaceuticals Inc., documento WO02018369), (2-carbamoil-1-ciclobutilmetil-2-oxoetil)amida del ácido 3-[2-(3-terc-butilureido)-3,3-dimetilbutiril]-6,6-dimetil-3-aza-biciclo[3.1.0]hexan-2-carboxílico (Boceprevir, Schering-Plough Research Institute, documento WO03062265), y 14-terc-butoxicarbonilamino-4-ciclopropansulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-3,16-diaza-triciclo[14.3.0.04,6]nonadec-7-en-18-il éster del ácido 4-fluoro-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (ITMN-191, InterMune Inc., documento US2005/0267018).

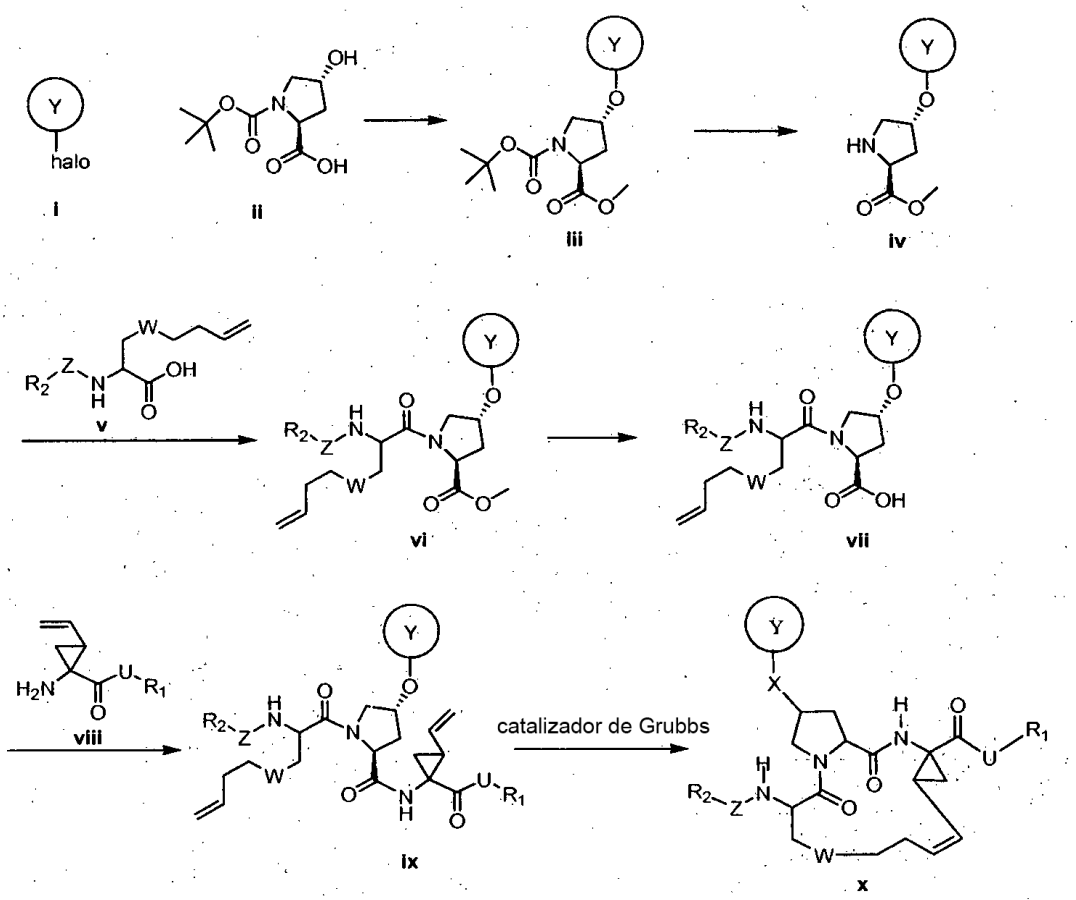
También dentro del alcance de esta invención se encuentra el uso de dicha composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento recién mencionado.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se indican en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

Los compuestos de esta invención pueden sintetizarse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado mediante métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar los compuestos de esta invención a través de la vía mostrada en el siguiente esquema 1:

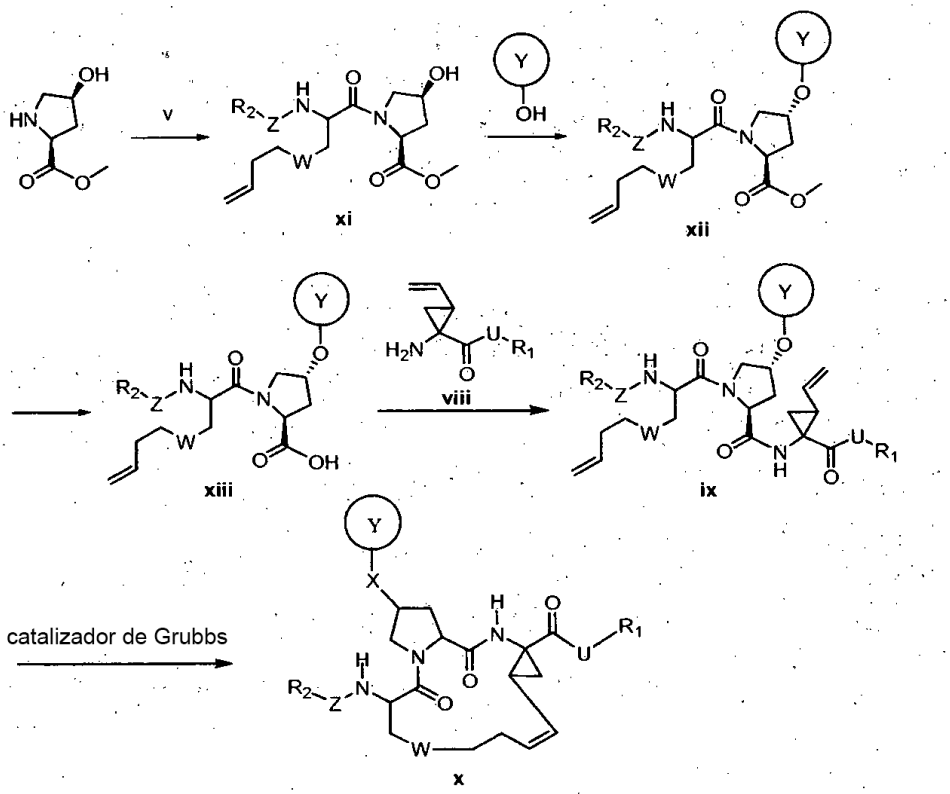
Esquema 1



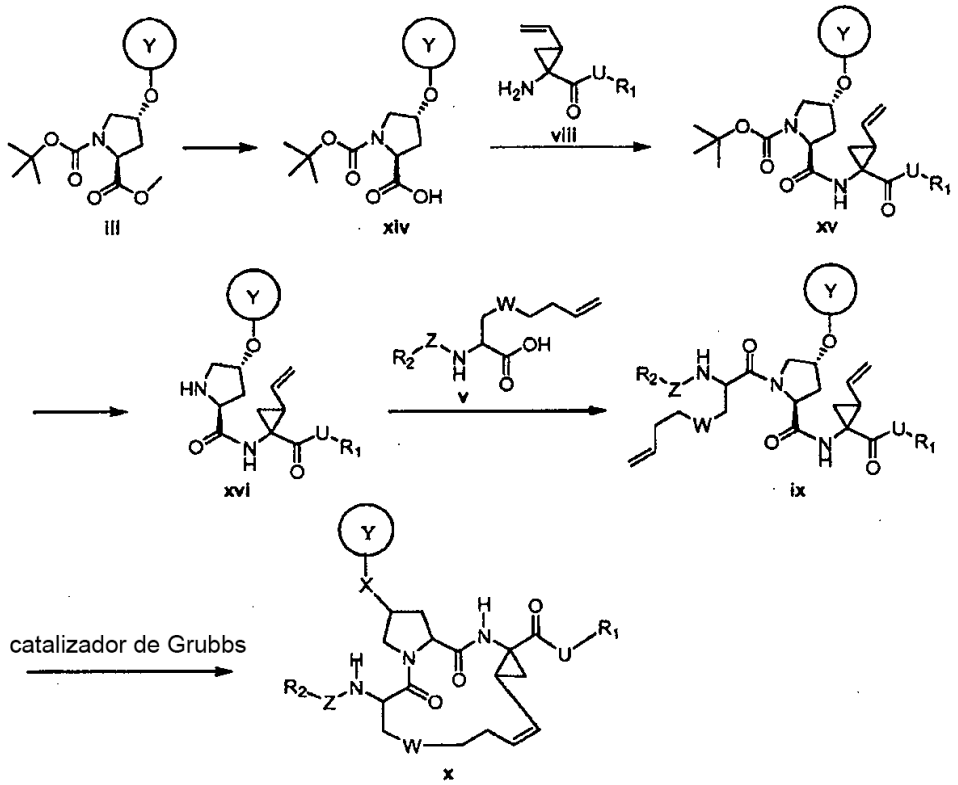
Tal como se ilustra en el esquema 1, un compuesto multicíclico (**i**) primero se acopla con N-(t-butoxicarbonil)-L-prolina (**ii**), seguido de una metilación, para formar el intermedio (**iii**). El intermedio (**iii**) se desproteje para retirar el grupo N-butoxicarbonilo para producir el compuesto sin N (**iv**), que se acopla con un ácido carboxílico (**v**) para producir el intermedio (**vi**). El intermedio (**vi**) se hidroliza para producir un ácido (**vii**), que se acopla con un compuesto de amina (**viii**) para proporcionar el compuesto de pirrolidina (**ix**) que tiene dos grupos alquenilo terminales. El intermedio (**ix**) sufre una metatesis de olefina en presencia de catalizador de Grubbs para producir el compuesto macrocíclico deseado (**x**).

Los siguientes esquemas 2 y 3 ilustran dos vías sintéticas alternativas para los compuestos de esta invención.

Esquema 2



Esquema 3

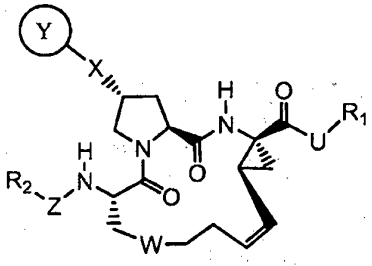


Los métodos descritos anteriormente también pueden incluir etapas, anteriores o posteriores a las etapas descritas específicamente en los esquemas 1-3, para añadir o retirar grupos protectores adecuados para lograr en último

término la síntesis de los compuestos deseados. Además, pueden realizarse diversas etapas sintéticas en una secuencia u orden alternado para producir los compuestos deseados. En la técnica son conocidas las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para sintetizar los compuestos aplicables de fórmula (I), e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser 's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) y sus posteriores ediciones.

Los siguientes ejemplos 1-60 proporcionan descripciones detalladas de la preparación real de los ejemplos de compuestos 1-60.

Los compuestos mencionados en la presente contienen un doble enlace no aromático y centros asimétricos. Así, pueden aparecer como racematos y mezclas racémicas, como enantiómeros individuales, diastereómeros individuales, mezclas diastereométicas, tautómeros y formas cis- o trans-isómeras. Se contemplan todas estas formas isómeras. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) mostrados anteriormente pueden poseer la siguiente configuración estereoquímica (III):



(III)

Los compuestos descritos anteriormente incluyen los propios compuestos, así como sus sales, profármacos y solvatos, si resulta aplicable. Puede formarse una sal, por ejemplo, entre un anión y un grupo cargado positivamente (por ejemplo, amino) sobre un compuesto de fórmula (I). Los aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, citrato, metansulfonato, trifluoroacetato, acetato, malato, tosilato, tartrato, fumurato, glutamato, glucuronato, lactato, glutarato, y maleato. De forma similar, también puede formarse una sal entre un catión y un grupo cargado negativamente (por ejemplo, carboxilato) sobre un compuesto de fórmula (I), Los cationes adecuados incluyen ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio, y un catión amonio, tal como ion tetrametilamonio. Los compuestos de fórmula (I) también incluyen las sales que contienen átomos de nitrógeno cuaternario. Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres y otros derivados farmacéuticamente aceptables que, tras su administración a un sujeto, son capaces de proporcionar compuestos activos de fórmula (I). Un solvato se refiere a un complejo formado entre un compuesto activo de fórmula (I) y un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, isopropanol, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.

También dentro del alcance de esta invención se encuentra un método para tratar una infección por HCV mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más compuestos de fórmula (I) a un paciente. El término “tratar” o “tratamiento” se refiere a la administración de los compuestos a un sujeto que tiene una infección por HCV, uno de sus síntomas, o una predisposición hacia ella, con el fin de conferir un efecto terapéutico, por ejemplo, para curar, aliviar, alterar, afectar, mejorar o prevenir una infección por HCV, uno de sus síntomas o la predisposición hacia ella. La expresión “una cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un compuesto activo de esta invención que se necesita para conferir un efecto terapéutico al sujeto tratado. La dosis eficaz variará, según reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, de la vía de administración, de la utilización de excipientes, y de la posibilidad de coutilización con otro tratamiento terapéutico.

Para practicar el método de la presente invención, una composición que contenga uno o más compuestos de esta invención puede administrarse por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal. El término “parenteal”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

Una composición inyectable estéril puede ser una disolución o una suspensión de un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una disolución en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el manitol, agua, disolución de Ringer, y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, habitualmente se emplean aceites no volátiles como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles para la preparación de inyectables, así como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales

como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones oleosas también puede contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Para la formulación también pueden usarse otros tensioactivos que se emplean habitualmente, tales como los Tween o Span, u otros agentes emulgentes o potenciadores de la biodisponibilidad similares, que se emplean habitualmente para la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables.

Una composición para la administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos, los vehículos que se emplean habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Generalmente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz secado. Cuando las emulsiones o suspensiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulgentes o suspensores. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Puede prepararse una composición para inhalación o aerosol nasal según técnica muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica. Por ejemplo, esta composición puede prepararse como una disolución en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Una composición que contenga uno o más compuestos activos de esta invención puede administrarse también en forma de supositorios para la administración rectal.

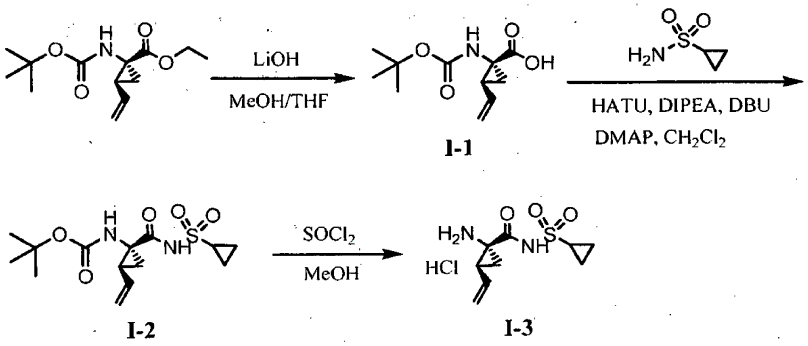
El vehículo en la composición farmacéutica debe ser “aceptable” en el sentido de que sea compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, que sea capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no ser perjudicial para el sujeto que se va a tratar. Pueden utilizarse uno o más agentes solubilizantes como excipientes farmacéuticos para la administración de un compuesto activo de esta invención. Los ejemplos de otros vehículos incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio, y amarillo D&C n.º 10.

Los compuestos de esta invención descritos anteriormente pueden seleccionarse de modo preliminar por su eficacia para tratar una infección por HCV mediante un ensayo *in vitro* (ejemplos 61 y 62 a continuación), y después confirmarse mediante experimentos en animales y ensayos clínicos. Otros métodos también serán evidentes para los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos específicos deben considerarse solamente ilustrativos y no limitantes del resto de la descripción de ninguna manera. Sin mayores explicaciones, se cree que los expertos en la técnica, basándose en la descripción en la presente, pueden utilizar la presente invención en su grado más completo. Todas las publicaciones citadas en la presente se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

Ejemplo 1: Síntesis del éster ciclopentílico del ácido {4-ciclopropansulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-[2-(4-trifluorometilfenil)benzo[4,5]furo[3,2-d]pirimidin-4-iloxi]-3,16-diaza-triciclo[14.3.0.04,6]nonadec-7-en-14-il}carbámico (compuesto 1)

El compuesto **I-3** se preparó primero a partir del éster etílico del ácido 1-*t*-butoxicarbonilamino-2-vinilciclopropancarboxílico disponible en el mercado a través de la vía mostrada a continuación:

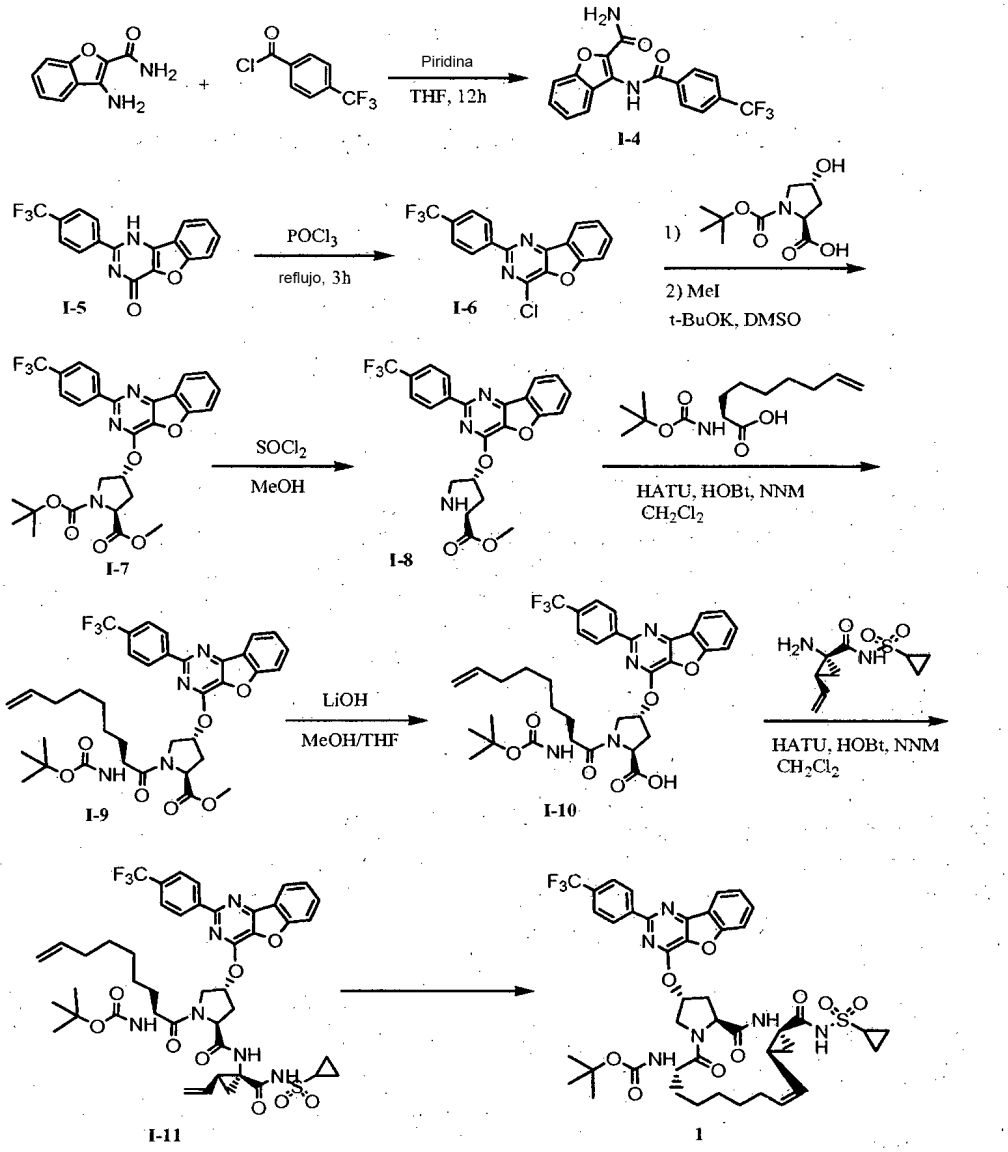


A una disolución del éster etílico del ácido 1-t-butoxicarbonilamino-2-vinilciclopropancarboxílico (0,34 g, 1,3 mmol) en THF (5 rnl) y metanol (5 rnl) se le añadió una suspensión de LiOH (0,13 g, 5,3 mmol) en agua (1,4 ml). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la reacción se extinguió con HCl al 10% (2 ml) y el disolvente se retiró al vacío. El polvo sólido resultante se lavó con agua (10 ml) para producir el compuesto **I-1** (0,27 g, 90%). MS m/z 249,9 (M^++23); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,35 (sa, 1H), 5,84-5,71 (m, 1H), 5,29 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 5,12 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 2,23-2,14 (m, 1H), 1,87-1,65 (m, 1H), 1,58-1,41 (m, 1H), 1,43 (s, 9H).

Una disolución del compuesto **I-1** (0,52 g, 2,3 mmol), metanaminio de hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 1,74 g, 4,6 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (1,39 g, 11,6 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la adición lenta de ciclopropansulfonamida (0,57 g, 4,7 mmol), diisopropiletilamina (1,81 ml, 14,0 mmol), y 1,8-diazabiciclo[5,4,0]undec-7-eno (1,80 g, 11,7 mmol) a lo largo de 15 minutos. Después la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice para producir el compuesto **I-2** (0,51 g, 66%). MS m/z 353,1 (M^++23); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 9,75 (sa, 1H), 5,64-5,51 (m, 1H), 5,30 (d, J = 17,4 H), 5,16 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 2,95-2,89 (m, 1H), 2,19-2,10 (m, 1H), 1,93-1,88 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,46-1,38 (m, 1H), 1,32-1,23 (m, 2H), 1,15-1,00 (m, 2H).

A una disolución del compuesto **I-2** (0,50 g, 1,5 mmol) en MeOH (8 ml) se le añadió $SOCl_2$ (0,26 g, 2,2 mmol) a temperatura ambiente. Después de que la mezcla de reacción se sometiese a reflujo durante 1 hora, se eliminaron el MeOH y el $SOCl_2$ al vacío. El residuo se trituró en pentano y se filtró para producir el intermedio **I-3** como un sólido blancuzco (0,32 g, 91%). MS m/z (M^++1); RMN de ^1H (CD_3COD) δ 5,77-5,65 (m, 1H), 5,43 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,45 (dd, J = 17,4 Hz, J = 7,8, 1H), 2,16 (dd, J = 8,0 Hz, J = 7,8 Hz, 1H), 1,75 (dd, J = 10.1 Hz, J = 7,8 Hz, 1H), 1,32-0,86 (m, 4H).

El compuesto 1 se preparó a través de la siguiente vía:



Una disolución de la amida del ácido 3-aminobenzofuran-2-carboxílico (1,00 g, 5,7 mmol) y piridina (1 ml, 12,26 mmol) en THF (25 ml) se agitó a 0 ºC durante 10 min. A la disolución resultante se le añadió lentamente cloruro de 4-trifluorometilbenzoílo (1,48 g, 7,1 mmol). Después la temperatura aumentó hasta la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 12 h. Después de que el disolvente se retirase a presión reducida, el sólido resultante se recogió, se lavó con agua y se secó al aire para producir **I-4** (1,92 g, 96,0%). MS: m/z 349,0 (M^++1).

Una suspensión de **I-4** (1,92 g, 5,5 mmol) y NaOH 2 N (13 ml) en EtOH (25 ml) se calentó a 85 ºC durante 12 h. Después de enfriar, la mezcla se acidificó y después se retiró el EtOH. El sólido resultante se recogió, se filtró, se lavó con agua, y se secó para producir **I-5** (1,71 g, 95,0%). MS: m/z 331 (M^++1).

Una disolución de **I-5** (1,71 g, 5,2 mmol) y un exceso de oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) se sometió a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar y de concentrar a fondo, la mezcla se sometió a una extracción con cloruro de metileno e hidróxido de sodio al 10%. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se concentró y se cristalizó en CH_2Cl_2 y *n*-hexano para producir el compuesto **I-6** (1,49 g, 82%). MS m/z 348,8, 350,9 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 8,70 (d, 2H), 8,34 (d, 1H), 7,82-7,75 (m, 4H), 7,57 (ddd, 1H).

A una suspensión de boc-trans-4-hidroxi-L-prolina (0,53 g, 2,3 mmol) en DMSO (25 ml) se le añadió *t*-BuOK (0,82 g, 5,1 mmol) a 0 ºC. Después de dejar que la mezcla se calentase hasta la temperatura ambiente y agitarse durante 1 hora, se añadió lentamente el compuesto **I-6** (0,81 g, 2,3 mmol) a 10 ºC. Se continuó la agitación durante la noche. Se añadió yodometano (1,02 g, 6,9 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos más. La mezcla de reacción se neutralizó hasta pH 6-7 mediante una disolución acuosa de HCl al 10% y se sometió a una extracción con cloruro de metileno. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se evaporó al vacío, y se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice para producir el compuesto **I-7** (1,12 g, 86%). MS m/z 557,8 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 8,63 (d, 2H), 8,28 (d, 1H), 7,80-7,74 (m, 2H), 7,70 (d, 2H), 7,51 (ddd, 1H).

A una disolución del compuesto **I-7** (1,13 g, 2,0 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió $SOCl_2$ (1,21 g, 9,8 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1 hora, y se retiraron el MeOH y el $SOCl_2$. El residuo se trituró en pentano. La suspensión se filtró para producir el compuesto **I-8** como un sólido blancuzco (0,87 g, 95%). MS m/z 458,1 (M^++1).

A una disolución de HATU (1,12 g, 3,0 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 0,41 g, 3,0 mmol), **I-8** (0,86 g, 1,9 mmol) y ácido 2-*t*-butoxicarbonilaminonon-8-enoico (1,21 g, 1,9 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml) a temperatura ambiente se le añadió N-metilmorfolina (NMM, 1,02 g, 9,9 mmol). Después de agitar durante la noche, la mezcla se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice para producir el compuesto **I-9** (1,03 g, 73%). MS m/z 711,3 (M^++1).

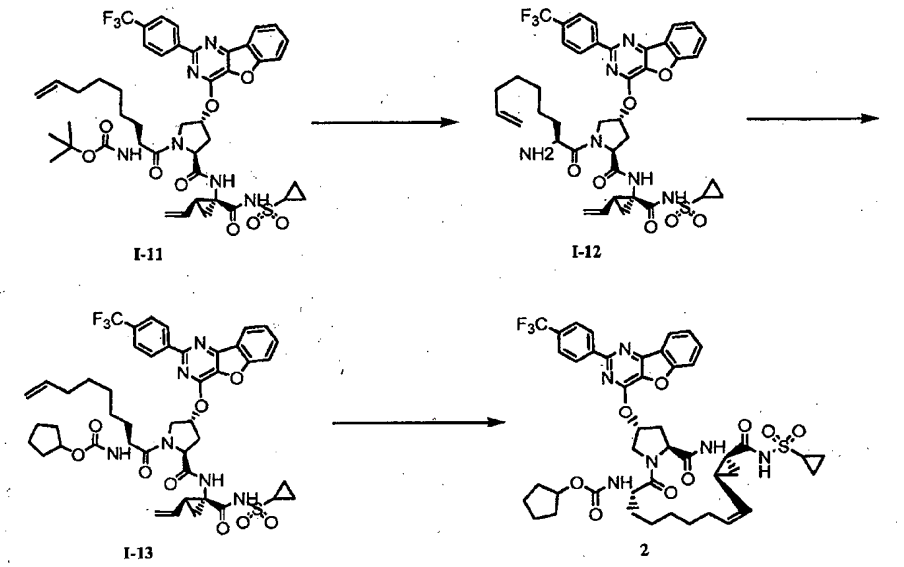
A una disolución del compuesto **I-9** (1,01 g, 1,4 mmol) en THF (20 ml) se le añadió LiOH 0,5 M (5,7 ml, 2,9 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la mezcla de reacción se neutralizó con HCl al 10% hasta pH < 7 y se concentró al vacío. El residuo resultante se filtró y se lavó con agua para producir el compuesto **I-10** (0,91 g, 92%). MS m/z 697,3 (M^++1).

Se añadió NMM (0,12 g, 1,2 mmol) a una disolución del compuesto **I-3** (0,28 g, 0,4 mmol), HATU (0,31 g, 0,8 mmol), HOBT (0,08 g, 0,6 mmol) y el compuesto **I-10** (0,09 g, 0,4 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice para producir el compuesto **I-11** (0,10 g, 85%). MS m/z 921,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,24 (s, 1H), 8,61 (d, 2H), 8,26 (d, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,73-7,64 (m, 2H), 7,54-7,47 (m, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,19 (d, 1H), 5,88-5,70 (m, 2H), 5,38-5,25 (m, 2H), 5,16 (d, 1H), 5,00-4,90 (m, 2H), 4,60 (dd, 1H), 4,88-4,34 (m, 2H), 4,18-4,10 (m, 1H), 2,98-2,89 (m, 1H), 2,68 (dd, 2H), 2,18-1,96 (m, 6H), 1,50-1,32 (m, 7H), 1,28 (s, 9H), 1,09-1,25 (m, 2H).

A una disolución del compuesto **I-11** (0,10 g, 0,11 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) se le añadió Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (35 mg, 0,056 mmol) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N_2. Despues, la mezcla de reacción se agitó a 40 ºC durante 24 h para realizar la ciclación por metatesis. La reacción se extinguió y la mezcla de reacción se purificó mediante una cromatografía en columna para producir el compuesto **1** (30 mg, 31%). MS: m/z 881,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,39 (s, 1H), 8,59 (d, 2H), 8,21 (d, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,69-7,57 (m, 2H), 7,46 (dd, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,12 (d, 1H), 4,97 (dd, 1H), 4,81-4,68 (m, 2H), 4,28-4,07 (m, 2H), 2,96-2,49 (m, 3H), 2,30 (q, 1H), 1,96- 1,12 (m, 14H), 1,08 (s, 9H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Ejemplo 2: Síntesis del éster ciclopentílico del ácido {4-ciclopropansulfonilaminocarbonil-2,15-dioxo-18-[2-(4-trifluorometilfenil)benzo[4,5]furo[3,2-d]pirimidin-4-iloxi]-3,16-diaza-triciclo[14.3.0.04,6]nonadec-7-en-14-il}carbámico (compuesto 2)

El compuesto 2 se preparó a través de la siguiente vía:



A una disolución **I-11** (0,11 g, 0,14 mmol) en 5 ml de CH_2Cl_2 se le añadió HCl 4 N en dioxano (2 ml) a temperatura ambiente durante 4 hr. Se eliminaron el HCl, el dioxano, y el CH_2Cl_2 mediante evaporación para producir el producto bruto **I-12**, que se empleó en la siguiente etapa sin más purificación.

El producto bruto **I-12** se disolvió en 2 ml de acetonitrilo y después se añadió una disolución acuosa de $NaHCO_3$ saturada (1 ml). Después de agitar durante 10 min se añadió cloroformiato de ciclopentilo (0,02 g, 0,15 mmol) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más. Después de extinguir mediante una disolución acuosa de $NaHCO_3$ saturada, la mezcla se sometió a una extracción con CH_2Cl_2 para producir el compuesto bruto **I-13** (0,11 g, 83%). MS: m/z 921,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,39 (s, 1H), 8,59 (d, 2H), 8,21 (d, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,69-7,57 (m, 2H), 7,46 (dd, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,12 (d, 1H), 4,97 (dd, 1H), 4,81-4,68 (m, 2H), 4,28-4,07 (m, 2H), 2,96-2,49 (m, 3H), 2,30 (q, 1H), 1,96-1,12 (m, 15H), 1,08 (s, 9H), 0,96-0,82 (m, 2H).

El compuesto **I-13** se trató con Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (35 mg, 0,056 mmol) para realizar la ciclación por metatesis según se describe en el ejemplo, para producir el compuesto **2**. MS: m/z 893,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,36 (s, 1H), 8,61 (d, 2H), 8,23 (d, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,69-7,43 (m, 3H), 7,09 (s, 1H), 6,16 (s, 1H), 5,71 (q, 1H), 5,17 (d, 1H), 4,98 (dd, 1H), 4,77 (dd, 1H), 4,48 (sa, 1H), 4,63 (d, 1H), 4,30-4,07 (m, 2H), 2,97-2,46 (m, 3H), 2,29 (q, 1H), 1,96-1,06 (m, 22H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Ejemplo 3-51: Síntesis del compuesto 3-51

Cada uno de los compuestos **3-51** se preparó de una manera similar a los descritos en los ejemplos 1 y 2.

Compuesto **3**: MS: m/z 857,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,42 (s, 1H), 8,41 (d, 2H), 7,97 (s, 1H), 7,51-7,35 (m, 2H), 7,20 (s, 1H), 7,02 (d, 2H), 6,10 (s, 1H), 5,68 (q, 1H), 5,16 (d, 1H), 4,96 (dd, 1H), 4,75 (dd, 1H), 4,65 (d, 1H), 4,34-4,07 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 2,97-2,50 (m, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,30 (q, 1H), 2,05-0,81 (m, 25H).

Compuesto **4**: MS: m/z 869,3 (M^++1).

Compuesto **5**: MS: m/z 803,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,31 (s, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,67-7,54 (m, 3H), 7,44 (dd, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,58 (dd, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,05 (d, 1H), 4,97 (dd, 1H), 4,74 (dd, 1H), 4,63 (d, 1H), 4,26-4,04 (m, 2H), 2,95-2,20 (m, 4H), 1,95-1,15 (m, 14H), 1,08 (s, 9H), 0,98-0,81 (m, 2H).

Compuesto **6**: MS: m/z 815,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,38 (s, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,67-7,38 (m, 4H), 7,28-7,21 (m, 2H), 6,58 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,30 (q, 1H), 5,26 (d, 1H), 5,02-4,86 (m, 1H), 4,80-4,68 (m, 1H), 4,57 (d, 1H), 4,53-4,46 (m, 1H), 4,31-4,18 (m, 1H), 4,08 (dd, 1H), 2,96-2,18 (m, 4H), 2,04-0,82 (m, 24H).

Compuesto **7**: MS: m/z 845,3 (M^++1).

Compuesto **8**: MS: m/z 857,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,33 (s, 1H), 8,46 (dd, 2H), 7,99 (s, 1H), 7,46 (dd, 2H), 7,18 (dd, 2H), 7,02 (s, 1H), 6,14 (s, 1H), 5,70 (q, 1H), 5,18-4,83 (m, 3H), 4,73 (dd, 1H), 4,55 (d, 1H), 4,36-4,06 (m, 2H), 3,63 (sa, 1H), 2,95-2,46 (m, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,25 (q, 1H), 2,05-0,76 (m, 23H).

Compuesto **9**: MS: m/z 813,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,44 (s, 1H), 8,48 (dd, 2H), 8,23 (d, 1H), 7,64-7,42 (m, 7H), 6,13 (s, 1H), 5,66 (q, 1H), 5,25 (d, 1H), 4,95 (dd, 1H), 4,75 (dd, 1H), 4,68 (d, 1H), 4,26-4,10 (m, 2H), 2,96-2,22 (m, 4H), 1,93-1,15 (m, 22H), 1,11 (s, 9H), 0,98-0,80 (m, 2H).

Compuesto **10**: MS: m/z 825,3 (M^++1).

Compuesto **11**: MS: m/z 831,5 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,45 (s, 1H), 8,42 (d, 2H), 7,82 (d, 1H), 7,58-7,42 (m, 4H), 7,40-7,21 (m, 2H), 6,07 (s, 1H), 5,63 (q, 1H), 5,23 (d, 1H), 4,91 (dd, 1H), 4,82-4,70 (m, 1H), 4,67 (d, 1H), 4,24-4,02 (m, 2H), 2,94-2,36 (m, 3H), 2,34-2,18 (m, 1H), 1,94-1,18 (m, 14H), 1,08 (s, 9H), 0,98-0,78 (m, 2H).

Compuesto **12**: MS: m/z 843,3 (M^++1).

Compuesto **13**: MS: m/z 877,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,38 (s, 1H), 8,51 (d, 2H), 8,19 (d, 1H), 7,78 (dd, 1H), 7,40-7,24 (m, 2H), 7,06 (d, 2H), 6,12 (s, 1H), 5,70 (q, 1H), 5,10 (d, 1H), 4,98 (dd, 1H), 4,68 (sa, 1H), 4,58 (d, 1H), 4,32-4,12 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 2,98-0,78 (m, 30H).

Compuesto **14**: MS: m/z 861,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,35 (s, 1H), 8,43 (d, 2H), 8,18 (dd, 1H), 7,76 (dd, 1H), 7,38-7,28 (m, 3H), 7,08 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,02 (d, 1H), 4,95 (dd, 1H), 4,67 (dd, 1H), 4,59 (d, 1H), 4,28-4,08 (m, 2H), 2,95-2,48 (m, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,32-2,16 (m, 1H), 1,94-0,78 (m, 25H).

Compuesto **15**: MS: m/z 847,2, 849,2 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,40 (s, 1H), 8,42 (d, 2H), 8,14 (s, 1H), 7,58-7,42 (m, 5H), 7,38 (s, 1H), 6,07 (s, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,16 (d, 1H), 4,93 (dd, 1H), 4,75 (dd, 1H), 4,65 (d, 1H), 4,24-4,30 (m, 1H), 2,95- 2,20 (m, 4H), 1,96-1,68 (m 5H), 1,60-1,20 (m, 10H), 1,09 (s, 9H), 0,98-0,80 (m, 2H).

Compuesto **16**: MS: m/z 859,6, 861,6 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,29 (s, 1H), 8,46 (dd, 2H), 8,20 (s, 1H), 7,60-7,49 (m, 5H), 6,98 (s, 1H), 6,16 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,10 (d, 1H), 4,95 (dd, 1H), 4,73 (dd, 1H), 4,55 (d, 1H), 4,25-4,10 (m, 2H), 2,96-2,22 (m, 4H), 1,96-0,84 (m, 25H).

Compuesto **17**: MS: m/z 843,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,41 (s, 1H), 8,44 (d, 2H), 8,23 (d, 1H), 7,68-7,42 (m, 3H), 7,19 (s, 1H), 7,04 (d, 2H), 6,14 (s, 1H), 5,68 (q, 1H), 5,15 (d, 1H), 4,97 (dd, 1H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,65 (d, 1H), 4,25 (dd, 1H), 4,12 (d, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,96-2,22 (m, 4H), 1,96-1,17 (m, 14H), 1,13 (s, 9H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Compuesto **18**: MS: m/z 855,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,37 (s, 1H), 8,45 (d, 2H), 8,25 (d, 1H), 7,70-7,53 (m, 2H), 7,45 (d, 1H), 7,09 (s, 1H), 7,04 (d, 2H), 6,17 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,24 (d, 1H), 4,98 (dd, 1H), 4,75 (dd, 1H), 4,57 (d, 1H), 4,30-4,09 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 2,97-2,44 (m, 3H), 2,28 (q, 1H), 1,96-1,06 (m, 25H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Compuesto **19**: MS: m/z 848,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,48 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,74 (d, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,24 (d, 1H), 7,55-46 (m, 2H), 7,19 (dd, 1H), 6,96 (d, 1H), 6,14 (s, 1H), 5,70 (q, 1H), 5,05-4,94 (m, 2H), 4,70 (dd, 1H), 4,63 (d, 1H), 4,67-4,51 (m, 2H), 2,96-2,51 (m, 3H), 2,28 (q, 1H), 1,96-1,12 (m, 14H), 1,12 (s, 9H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Compuesto **20**: MS: m/z 846,3 (M^++1).

Compuesto **21**: MS: m/z 838,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,34 (s, 1H), 8,28 (d, 1H), 8,11 (dd, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,62-7,52 (m, 2H), 7,40 (ddd, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,15 (s, 1H), 5,65 (q, 1H), 5,06 (d, 1H), 4,93 (dd, 1H), 4,75 (d, 1H), 4,68 (dd, 1H), 4,26-4,16 (m, 1H), 4,07 (dd, 1H), 2,92-2,50 (m, 3H), 2,30 (q, 1H), 1,93-0,81 (m, 25H).

Compuesto **22**: MS: m/z 850,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,34 (s, 1H), 8,28 (d, 1H), 8,10 (dd, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,62-7,52 (m, 2H), 7,38 (ddd, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,19 (d, 1H), 4,97-4,83 (m, 2H), 4,76 (d, 1H), 4,66 (dd, 1H), 4,31-4,20 (m, 1H), 4,06 (dd, 1H), 2,94-2,48 (m, 3H), 2,28 (q, 1H), 1,90-0,82 (m, 24H).

Compuesto **23**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,41 (s, 1H), 8,31 (d, 1H), 8,13 (dd, 1H), 7,79 (dd, 1H), 7,67-7,56 (m, 2H), 7,46 (dd, 1H), 7,39 (ddd, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,18 (s, 1H), 5,66 (q, 1H), 5,07 (d, 1H), 4,94 (dd, 1H), 4,75 (d, 1H), 4,68 (dd, 1H), 4,27-4,17 (m, 1H), 4,08 (dd, 1H), 2,93-2,48 (m, 3H), 2,31 (q, 1H), 1,92-1,26 (m, 13H), 1,22 (s, 9H), 1,20-0,81 (m, 4H).

Compuesto **24**: MS: m/z 816,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,33 (s, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,11 (dd, 1H), 7,88 (dd, 1H), 7,67-7,56 (m, 2H), 7,46 (dd, 1H), 7,43-7,30 (m, 2H), 6,12 (s, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,22 (d, 1H), 4,92 (dd, 1H), 4,77 (d, 1H), 4,66 (dd, 1H), 4,32-4,22 (m, 1H), 4,04 (dd, 1H), 2,93-2,46 (m, 3H), 2,31 (q, 1H), 1,92-0,80 (m, 25H).

Compuesto **25**: MS: m/z 818,3 (M^++1).

Compuesto **26**: MS: m/z 830,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,40 (s, 1H), 8,18-8,00 (m, 2H), 7,85 (d, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,47-7,25 (m, 3H), 6,09 (s, 1H), 5,65 (q, 1H), 5,21 (d, 1H), 5,02-4,66 (m, 4H), 4,33-4,20 (m, 1H), 4,04 (d, 1H), 4,03 (s, 3H), 2,95-2,40 (m, 6H), 2,32 (q, 1H), 1,96-0,78 (m, 24H).

Compuesto **27**: MS: m/z 786,3 (M^++1).

Compuesto **28**: MS: m/z 798,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,37 (s, 1H), 8,35 (d, 1H), 8,22 (d, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,67-7,61 (m, 3H), 7,49-7,38 (m, 2H), 7,33 (s, 1H), 6,17 (s, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,29 (d, 1H), 4,92 (dd, 1H), 4,83-4,64 (m, 2H), 4,33 (dd, 1H), 4,08 (d, 1H), 2,96-2,24 (m, 4H), 1,91-1,02 (m, 23H), 0,96-0,82 (m, 2H).

Compuesto **29**: MS: m/z 834,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,31 (s, 1H), 8,20-8,09 (m, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,45-7,32 (m, 2H), 7,14 (s, 1H), 7,12 (d, 1H), 6,25 (s, 1H), 5,66 (q, 1H), 5,06 (d, 1H), 4,94 (dd, 1H), 4,77 (d, 1H), 4,72- 4,62 (m, 1H), 4,29-4,14 (m, 1H), 4,09 (d, 1H), 4,03 (s, 3H), 2,93-2,24 (m, 4H), 1,96- 0,78 (m, 25H).

Compuesto **30**: MS: m/z 847,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,37 (s, 1H), 8,13 (dd, 1H), 7,93-7,77 (m, 2H), 7,46-7,28 (m, 3H), 7,12 (d, 1H), 6,19 (s, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,21 (d, 1H), 4,98-4,83 (m, 2H), 4,77 (d, 1H), 4,64 (dd, 1H), 4,34-4,05 (m, 2H), 4,02 (s, 3H), 2,92-2,24 (m, 4H), 1,94-0,76 (m, 24H).

Compuesto **31**: MS: m/z 848,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,29 (s, 1H), 8,16 (dd, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,48-7,34 (m, 2H), 7,20-7,06 (d, 2H), 6,27 (s, 1H), 5,69 (q, 1H), 5,05 (d, 1H), 4,96 (dd, 1H), 4,83 (d, 1H), 4,69 (dd, 1H), 4,36- 4,16 (m, 3H), 4,10 (dd, 1H), 2,95-2,54 (m, 3H), 2,36 (q, 1H), 1,96-0,81 (m, 28H).

Compuesto **32**: MS: m/z 860,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,41 (s, 1H), 8,10 (dd, 1H), 7,93-7,68 (m, 3H), 7,39-7,28 (m, 2H), 7,09 (d, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,58 (q, 1H), 5,38 (d, 1H), 4,96-4,76 (m, 3H), 4,68 (dd, 1H), 4,36-4,19 (m, 3H), 4,05 (dd, 1H), 2,92-2,30 (m, 4H), 1,94-0,76 (m, 27H).

Compuesto **33**: MS: m/z 816,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,33 (s, 1H), 8,31 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 7,66-7,56 (m, 2H), 7,51-7,41 (m, 2H), 7,06 (s, 1H), 7,05 (dd, 1H), 6,16 (s, 1H), 5,40 (q, 1H), 5,07 (d, 1H), 4,95 (dd, 1H), 4,76 (d, 1H), 4,64 (dd, 1H), 4,32-4,21 (m, 1H), 4,06 (dd, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,93-2,24 (m, 4H), 1,94-0,78 (m, 25H).

Compuesto **34**: MS: m/z 828,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,41 (s, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,67-7,55 (m, 3H), 7,46 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,03 (dd, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,63 (q, 1H), 5,52-5,40 (m, 1H), 5,32 (d, 1H), 5,10-4,64 (m, 3H), 4,38-4,26 (m, 1H), 4,13-4,02, (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,93-2,24 (m, 4H), 2,04-0,81 (m, 24H).

Compuesto **35**: MS: m/z 830,3 (M^++1).

Compuesto **36**: MS: m/z 842,4 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,37 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,09 (d, 1H), 7,54-7,38 (m, 4H), 7,02 (d, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,62 (q, 1H), 5,33 (d, 1H), 4,96-4,62 (m, 3H), 4,33 (dd, 1H), 4,06 (dd, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,96-2,62 (m, 3H), 2,53 (s, 3H), 2,50-2,24 (m, 1H), 1,91-0,82 (m, 24H).

Compuesto **37**: MS: m/z 846,4 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,35 (s, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,11-6,96 (m, 4H), 6,09 (s, 1H), 5,68 (q, 1H), 5,10-5,00 (m, 1H), 4,96 (dd, 1H), 4,75 (d, 1H), 4,68-4,57 (m, 1H), 4,34-4,22 (m, 1H), 4,05 (d, 1H), 3,94 (s, 6H), 2,95-2, 22 (m, 4H), 1,95-0,76 (m, 25H).

Compuesto **38**: MS: m/z 858,3 (M^++1).

Compuesto **39**: MS: m/z 862,4 (M^++1).

Compuesto **40**: MS: m/z 874,4 (M^++1).

Compuesto **41**: MS: m/z 848,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,37 (s, 1H), 8,25 (dd, 1H), 7,75 (dd, 1H), 7,23 (d, 1H), 7,50 (d, 1H), 7,25-7,14 (m, 3H), 6,15 (s, 1H), 5,62 (q, 1H), 5,17 (d, 1H), 4,90 (dd, 1H), 4,76 (d, 1H), 4,68 (dd, 1H), 4,29-4,02 (m, 4H), 2,92-2,45 (m, 3H), 2,29 (q, 1H), 1,92-0,81 (m, 28H).

Compuesto **42**: MS: m/z 818,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,34 (s, 1H), 8,26 (dd, 1H), 7,82-7,18 (m, 3H), 7,51 (d, 1H), 7,26-7,14 (m, 2H), 6,18 (s, 1H), 5,66 (q, 1H), 5,21 (d, 1H), 4,94 (dd, 1H), 4,80-4,64 (m, 2H), 4,34-4,02 (m, 5H), 2,92-2,20 (m, 4H), 1,96-0,78 (m, 27H).

Compuesto **43**: MS: m/z 834,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,40 (s, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,09 (dd, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,43-7,32 (m, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,10-7,01 (m, 2H), 6,11 (s, 1H), 5,68 (q, 1H), 5,09 (d, 1H), 4,96 (dd, 1H), 4,76 (d, 1H), 4,68 (dd, 1H), 4,32-4,02 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 2,94-2,28 (m, 4H), 1,96-0,79 (m, 25H).

Compuesto **44**: MS: m/z 846,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,34 (s, 1H), 8,18 (d, 1H), 8,12 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,46-7,35 (m, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,05 (dd, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,71 (q, 1H), 5,12 (d, 1H), 4,02-4,93 (m, 2H), 4,80 (d, 1H), 4,65 (dd, 1H), 4,36-4,24 (m, 1H), 4,12-4,01 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 2,96-2,24 (m, 4H), 1,96-0,79 (m, 24H).

Compuesto **45**: MS: m/z 862,3 (M^++1).

Compuesto **46**: MS: m/z 874,3 (M^++1).

Compuesto **47**: MS: m/z 834,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,45 (s, 1H), 8,28 (dd, 1H), 8,07-7,85 (m, 2H), 7,39 (dd, 1H), 7,23-7,13 (m, 3H), 6,40 (s, 1H), 5,66 (q, 1H), 5,02 (d, 1H), 4,93 (dd, 1H), 4,82 (d, 1H), 4,70 (dd, 1H), 4,24-4,14 (m, 1H), 4,09 (dd, 1H), 4,03 (s, 3H), 2,94-2,28 (m, 4H), 1,96-0,79 (m, 25H).

Compuesto **48**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,39 (s, 1H), 8,25 (d, 1H), 8,14 (d, 1H), 8,01 (dd, 1H), 7,65 (dd, 1H), 7,56 (dd, 1H), 7,46-7,31 (m, 3H), 6,14 (s, 1H), 5,62 (q, 1H), 5,21 (d, 1H), 4,90 (dd, 1H), 4,76 (d, 1H), 4,70 (dd, 1H), 4,34-4,23 (m, 1H), 4,14-4,03 (m, 1H), 2,91-2,24 (m, 4H), 2,05-0,82 (m, 25H).

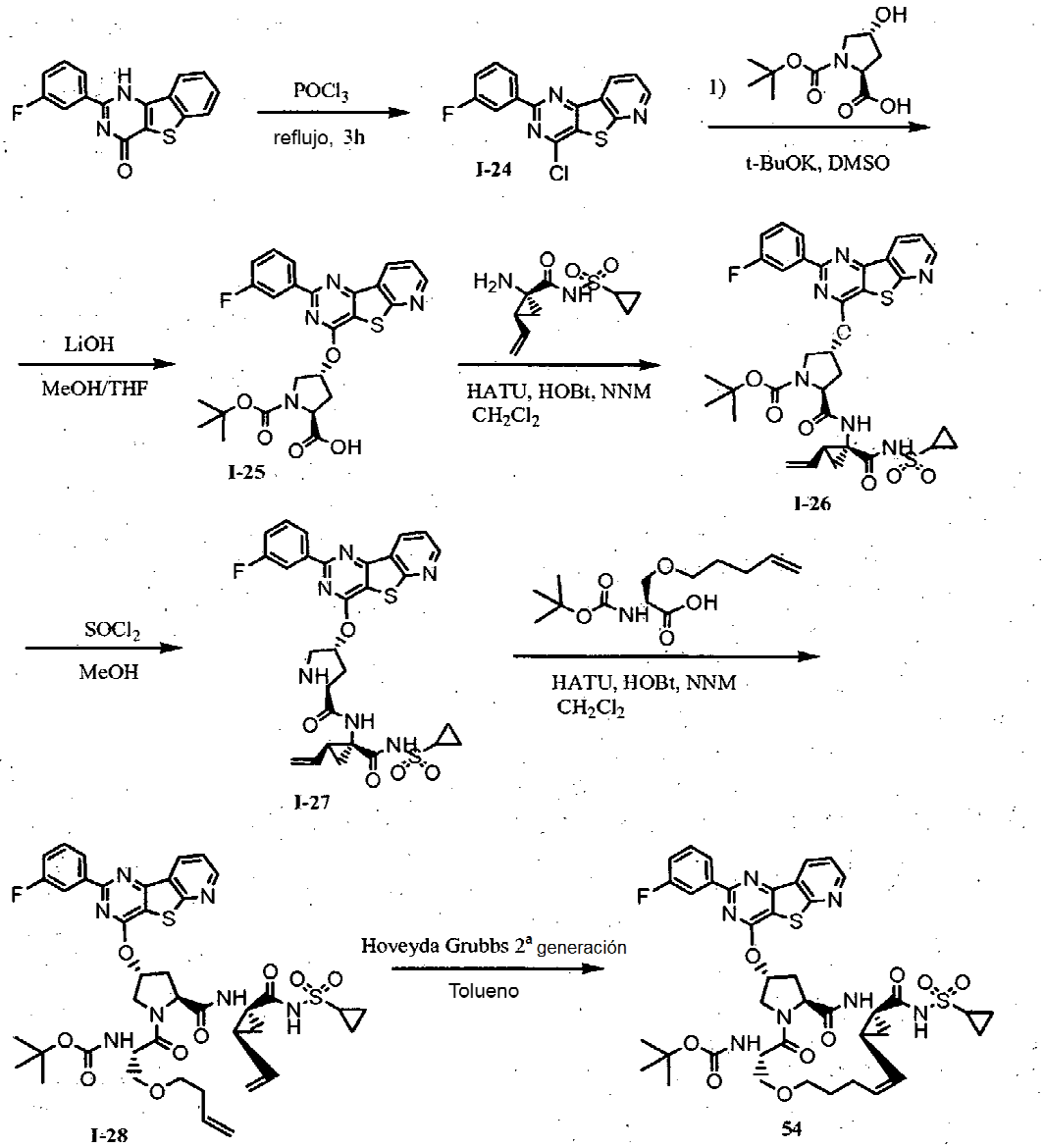
Compuesto **49**: MS: m/z 816,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,40 (s, 1H), 8,22 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 7,98 (dd, 1H), 7,62 (dd, 1H), 7,58-7,50 (m, 2H), 7,43-7,28 (m, 2H), 6,10 (s, 1H), 5,57 (q, 1H), 5,36 (d, 1H), 4,96-4,82 (m, 1H), 4,80-4,64 (m, 3H), 4,36-4,01 (m, 2H), 2,91-2,22 (m, 4H), 2,10-0,81 (m, 24H).

Compuesto **50**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,01 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,01 (dd, 1H), 7,75 (dd, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,35-7,01 (m, 3H), 6,11 (s, 1H), 5,58-5,42 (m, 2H), 4,68 (dd, 1H), 4,19-4,03 (m, 3H), 3,94 (s, 3H), 2,91-2,24 (m, 4H), 2,05-0,82 (m, 25H).

Compuesto **51**: MS: m/z 816,3 (M^++1); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) δ 10,28 (s, 1H), 8,25 (d, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,01 (dd, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,58 (dd, 1H), 7,45 (dd, 1H), 7,35 (ddd, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,18 (s, 1H), 5,67 (q, 1H), 5,16 (d, 1H), 4,94 (dd, 1H), 4,98-4,61 (m, 2H), 4,35-4,24 (m, 1H), 4,08 (dd, 1H), 2,91-2,22 (m, 4H), 2,10-0,81 (m, 24H).

Ejemplo 52: Síntesis del éster *terc*-butílico del ácido {4-ciclopropansulfonilaminocarbonil-18-[6-(3-fluorofenil)-9-tia-1,5,7-triazafluoren-8-iloxi]-2,15-dioxo-12-oxa-3,16-diaza-triciclo[14.3.0.04,6]nonadec-7-en-14-il}carbámico (compuesto 54)

El compuesto 54 se preparó a través de la siguiente vía:



Una disolución de 6-(3-fluorofenil)-7H-9-tia-1,5,7-triazafluoren-8-ona (1,83 g, 6,16 mmol) en $POCl_3$ (5,66 ml, 61,6 mmol) se calentó hasta el reflujo durante 3 horas. Después de la eliminación del $POCl_3$ al vacío, el residuo se vertió en agua y se extinguió con $NaHCO_3$ saturado hasta pH > 7, se agitó durante 15 minutos, y después se filtró para producir el compuesto bruto **I-24** (1,82 g, 93%). ESI-MS ($M+H^+$) = 316,0.

A una suspensión de Boc-4R-hidroxiprolina (1,33 g, 5,76 mmol) en DMSO (13,3 ml) se le añadió *t*-BuOK (1,94 g, 17,28 mmol) a temperatura ambiente. Después de que la mezcla de reacción se agitase durante 1,5 horas, el compuesto **I-24** (1,82 g, 5,76 mmol) se disolvió en DMSO (18,2 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción en un baño de agua helada durante la noche. La mezcla resultante se vertió en agua fría, y la disolución acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH < 2 y se filtró para producir el compuesto **I-25** bruto (2,77 g, 94%). ESI-MS ($M+H^+$) = 511,1.

Se añadió NMM (3,67 ml, 33,4 mmol) a una disolución del compuesto **I-25** (3,41 g, 6,68 mmol), HATU (5,08 g, 13,36 mmol), HOBt (1,35 g, 10,02 mmol) y (1-amino-2-vinilciclopropancarbonil)amida del ácido ciclopropansulfónico (1,69 g, 7,35 mmol) en CH_2Cl_2 (33,4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se extinguió con NH_4Cl saturado, se extrajo con CH_2Cl_2, se lavó con $NaHCO_3$ saturado y salmuera, y se secó sobre $MgSO_4$. Después de una concentración, el residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc al 50% en hexano) para producir el compuesto **I-26** (3,20 g, 66%). ESI-MS ($M+H^+$) = 723,2.

A una disolución de **I-26** (0,51 g, 0,69 mmol) en CH_2Cl_2 (3,45 ml) se le añadió CF_3COOH (0,53 ml, 6,9 mmol) a temperatura ambiente. Después de haber agitado la mezcla de reacción durante la noche, la disolución se concentró

para producir el compuesto bruto **I-27**, que se empleó en la siguiente etapa sin más purificación. ESI-MS ($M+H^+$) = 623,2.

Se añadió NMM (0,3 ml, 2,76 mmol) a una disolución del compuesto **I-27** (0,43 g, 0,69 mmol), HATU (0,34 g, 0,9 mmol) y ácido (s)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-3-(pent-4-eniloxi)propanoico (0,25 g, 0,9 mmol) en CH_2Cl_2 (3,45 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se extinguió con NH_4Cl saturado, se extrajo con CH_2Cl_2, se lavó con $NaHCO_3$ saturado y salmuera, y se secó sobre $MgSO_4$. Después de una concentración, el residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc al 50% en hexano) para producir el compuesto **I-28** (0,52 g, 85%). ESI-MS ($M+H^+$) = 877,7.

Una disolución de **I-28** (0,52 g, 0,59 mmol) en tolueno (59 ml) se desgasificó con nitrógeno. Se añadió catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (0,04 g, 10% mol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó hasta 50 ºC durante la noche. Se concentró el disolvente y el residuo se purificó mediante TLC (MeOH al 1% en éter) para producir el compuesto **54** (0,07 g, 14%). ESI-MS ($M+H^+$) = 850,2; RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,16 (s, 1H), 8,86-8,58 (m, 2H), 8,38 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,57-7,46 (m, 2H), 7,20 (dd, 1H), 6,28-6,20 (m, 1H), 5,64 (q, 1H), 5,31 (d, 1H), 5,21 (dd, 1H), 4,93 (dd, 1H), 4,68-4,58 (m, 1H), 4,39 (dd, 1H), 4,17-4,09 (m, 1H), 3,68 (dd, 1H), 3,50-3,32 (m, 2H), 3,10-2,88 (m, 2H), 2,61-2,46 (m, 2H), 2,26-2,10 (2H), 2,02-1,76 (m, 2H), 1,55-1,38 (m, 4H), 1,34 (s, 9H), 1,31-0,82 (m, 4H).

Ejemplo 53-58: Síntesis del compuesto 55-60

Cada uno de los compuestos **55-60** se preparó de una manera similar a la descrita en el ejemplo 52.

Compuesto **55**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,19 (s, 1H), 8,81 (d, 1H), 8,37 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,60-7,16 (m, 5H), 6,25 (s, 1H), 5,65 (q, 1H), 5,45 (d, 1H), 5,21 (dd, 1H), 4,93 (sa, 1H), 4,74-4,61 (m, 1H), 4,43-4,34 (m, 1H), 4,13 (d, 1H), 3,75-3,34 (m, 4H), 3,08-2,88 (m, 2H), 2,63-2,45 (m, 2H), 2,27-0,81 (m, 19H).

Compuesto **56**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,06 (s, 1H), 8,21 (dd, 1H), 7,91 (d, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,39 (dd, 1H), 7,30-7,22 (m, 1H), 7,16 (d, 1H), 6,24 (s, 1H), 5,63 (q, 1H), 5,39 (d, 1H), 5,18 (dd, 1H), 4,89 (dd, 1H), 4,68-4,58 (m, 1H), 4,43 (d, 1H), 4,13-4,06 (m, 1H), 4,07 (s, 3H), 3,72 (dd, 1H), 3,52 (dd, 1H), 3,45-3,38 (m, 1H), 3,09-3,87 (m, 2H), 2,68 (dd, 1H), 2,53-1,91 (m, 4H), 1,57-1,41 (m, 6H), 1,37 (s, 9H), 1,28-0,82 (m, 3H).

Compuesto **57**: MS: m/z 848,2 (M^++1).

Compuesto **58**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,20 (s, 1H), 8,33 (d, 1H), 8,16 (dd, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,68-7,36 (m, 6H), 6,22 (s, 1H), 5,62 (q, 1H), 5,42 (d, 1H), 5,16 (dd, 1H), 4,99 (sa, 1H), 4,92 (dd, 1H), 4,68-4,60 (m, 1H), 4,37 (d, 1H), 4,16-4,08 (m, 1H), 3,73-3,35 (m, 4H), 3,08-2,87 (m, 2H), 2,69-2,40 (m, 2H), 2,32-0,81 (m, 17H).

Compuesto **59**: MS: m/z 804,3 (M^++1); RMN de ^1H ($CDCl_3$) δ 10,18 (s, 1H), 8,34 (d, 1H), 8,17 (dd, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,73-7,40 (m, 4H), 7,35 (s, 1H), 6,23 (s, 1H), 5,63 (q, 1H), 5,48 (d, 1H), 5,17 (dd, 1H), 4,99 (sa, 1H), 4,91 (dd, 1H), 4,74-4,62 (m, 1H), 4,40 (d, 1H), 4,17-4,08 (m, 1H), 3,75-3,35 (m, 4H), 3,08-2,87 (m, 2H), 2,73- 2,40 (m, 2H), 2,30-0,81 (m, 18H).

Compuesto **60**: MS: m/z 838,4 (M^++1).

Ejemplo 59: Inhibición de la expresión de proteína de la NS3/4A proteasa y purificación

Un plásmido que contiene un gen que codifica $NS4A_{(21-32)}$-GSGS-$NS3_{(3-181)}$ marcado con His_6 en el N-terminal se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) pLysS (Novagen) para la sobreexpresión de proteínas. Se cultivó una única colina de BL21 (DE3) pLysS transformado en 200 ml de medio Lauria-Bertani (LB) con kanamicina y cloranfenicol a 37 ºC durante la noche. El cultivo bacteriano se trasladó a 6 l de medio LB (Difco) que contenía antibióticos y se incubó con agitación a 22 ºC. Después de que la absorbancia a 600 nm alcanzase 0,6, el cultivo se indujo con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranósido (IPTG) 1 mM a 22 ºC durante 5 horas. El cultivo después se recolectó mediante centrifugación (6.000 x g durante 15 minutos a 4 ºC). Los sedimentos celulares se resuspendieron en 150 ml de tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,3 M, CHAPS al 0,1% (en p/v), imidazol 10 mM, glicerol al 01% (en v/v)). Después la mezcla se desorganizó mediante cuatro pasadas a través de un Microfluidizer que funcionaba a 0,0206 MPa, y el sedimento celular se retiró mediante centrifugación (58.250 x g durante 30 minutos a 4 ºC). El lisado celular que contenía las proteínas marcadas con His_6 se cargó a 3 ml/min sobre una columna Ni-NTA de 25 ml (Qiagen) en presencia de imidazol 10 mM empleando un sistema gradiFrac (Pharmacia). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna del tampón de lisis. El $NS4A_{(21-32)}$-GSGS-$NS3_{(3-181)}$ unido se eluyó con 8 volúmenes de columna de tampón A suplementado con imidazol 300 mM. Las fracciones reunidas se volvieron a purificar mediante una columna de Q-Sepharose equilibrada con tampón B (HEPES 50 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,1% (en p/v), glicerol al 10% (en v/v), ditiotreitol (DTT) 5 mM, y NaCl 1 M). El eluyente que contenía $NS4A_{(21-32)}$-GSGS-$NS3_{(3-181)}$ se recogió y se volvió a purificar mediante una cromatografía de exclusión molecular a un caudal de 0,5 ml/min empleando una columna Sephacryl-75 (16 x 100 cm, Pharmacia) preequilibarada con tampón C (HEPES 50 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,1% (en p/v), DTT 5 mM, glicerol al 10% (en v/v)). La proteína purificada se congeló y se conservó a -80 ºC antes de su uso.

Ensayo de HPLC de microorificios

Se preparó una disolución que contenía Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, glicerol al 20%, CHAPS al 0,012%, DTT 10 mM, sustrato Ac-Asp-Glu-Asp(EDANS)-Glu-Glu-Abu-Ψ-[COOAla]-Ser-Lys(DABCYL)-NH_2 (RET S1, ANASPEC) 5 μM y compuesto de ensayo 10 μM. Se añadieron 80 μl de la disolución a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La reacción se inició mediante la adición de 20 μl de NS3/4A proteasa 10 nM en un tampón que contenía tampón Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, glicerol al 20% y CHAPS al 0,012%. La concentración final de la NS3/4A proteasa fue de 2 nM, que es menor que la Km del sustrato RET S1.

La disolución de ensayo se incubó durante 30 minutos a 30 ºC. La reacción después se terminó mediante la adición de 100 μl de TFA al 1%. Una parte alícuota de 200 μl se trasladó a cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos Agilent.

Los productos de la reacción se analizaron empleando la HPLC de fase inversa descrita a continuación. El sistema de HPLC incluye: Agilent 1100, desgasificador G1379A, bomba binaria G1312A, muestreador automático G1367A, cámara termostatizada de columna Gl 316 A, detector de matriz de diodos G1315B, columna: Agilent, ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 mm, 5 μm, P/N 993967-902, termostato de la columna: temperatura ambiente, volumen de inyección: 100 μl, disolvente A = agua de calidad HPLC + TFA al 0,09%, disolvente B = acetonitrilo de calidad HPLC + TFA al 0,09%. El tiempo de funcionamiento total de la HPLC fue de 7,6 minutos, con un gradiente lineal de disolvente B del 25% al 50% en 4 minutos, disolvente B al 50% durante 30 segundos, y un gradiente de disolvente B del 50% al 25% durante 30 segundos más. La columna se reequilibró con disolvente B al 25% duranet 2,6 minutos antes de inyectar la siguiente muestra. El valor de IC_{50} (la concentración en la que se observa 50% de inhibición de la actividad NS3/4A) se calculó para cada compuesto de ensayo basándose en los resultados de HPLC.

Los compuestos 1-60 se ensayaron con el anterior ensayo de inhibición. Los resultados demuestran que 54 compuestos muestran unos valores de IC_{50} menores que 20 nM y que 4 compuestos muestran unos valores de IC_{50} en el intervalo de 20-100 nM.

Ejemplo 60: Protocolo de ensayo de células con replicón de HCV

Células que contenían un replicón de HCV se mantuvieron en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%, 1,0 mg/ml de G418, y suplementos apropiados (medio A).

En el día 1, la monocapa de células con replicón se trató con una mezcla de tripsina/EDTA, se retiró y se diluyó con medio A hasta una concentración final de 48.000 células/ml. La disolución (1 ml) se añadió a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos, y se cultivó durante la noche en un incubador de cultivos de tejidos a 37 ºC con CO_2 al 5%.

En el día 2, un compuesto de ensayo (en DMSO al 100%) se diluyó en serie con DMEM que contenía FBS al 10% y suplementos apropiados (medio B). La concentración final de DMSO se mantuvo al 0,2% a lo largo de la serie de dilución.

Se retiró el medio sobre la monocapa de células con replicón, y después se añadió medio B que contenía diversas concentraciones de compuestos. El medio B sin compuesto se añadió a otros pocillos como control sin compuesto.

Las células se incubaron con un compuesto o con DMSO al 0,2% en medio B durante 72 horas en un incubador de cultivos de tejidos con CO_2 al 5% a 37 ºC. Después el medio se retiró y la monocapa de células con replicón se lavó una vez con PBS. Se añadieron reactivos de extracción de ARN de kits RNeasy o reactivos TRIZOL a las células inmediatamente para evitar la degradación del ARN. El ARN total se extrajo según las instrucciones proporcionadas por el fabricante con modificaciones para mejorar la coherencia y eficacia de la extracción. Por último, se eluyó el ARN celular total, que incluye el ARN del replicón de HCV, y se conservó a -80 ºC hasta su posterior procesamiento.

Se dispuso un ensayo de cuantificación de RT-PCR a tiempo real TaqMan® con dos conjuntos de cebadores específicos: uno para HCV y otro para ACTB (beta-actina). El ARN total se añadió a las reacciones de PCR para la cuantificación del ARN de HCV y ACTB en el mismo pocillo de PCR. Se marcó el fallo experimental y se rechazó basándose en el nivel de ARN de ACTB en cada pocillo. El nivel de ARN de HCV en cada pocillo se calculó según un ensayo de curva patrón en la misma placa de PCR. El porcentaje de inhibición del nivel de ARN de HCV por el tratamiento con el compuesto se calculó empleando DMSO o el control sin compuesto como 0% de inhibición. Se calculó la EC50 (la concentración a la cual se logra 50% de inhibición del nivel de ARN de HCV) a partir de la curva de titulación de cualquier compuesto concreto.

Los compuestos 1-60 se ensayaron en el ensayo de células con replicón de HCV. Los resultados muestran que 52 compuestos mostraron unos valores de EC_{50} menores que 20 nM, y que 3 compuestos mostraron unos valores de EC_{50} en el intervalo de 20-100 nM.

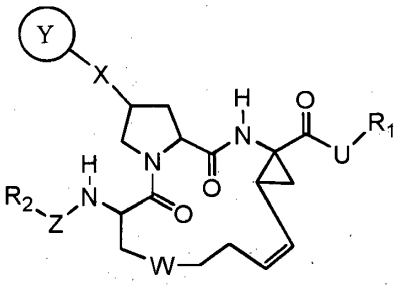
Otras realizaciones

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede ser reemplazada por una característica alternativa que sirva para un propósito idéntico, equivalente o similar. Así, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la anterior descripción, los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las características fundamentales de la presente invención y, sin apartarse de su espíritu ni su alcance, pueden realizar diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversas utilizaciones y condiciones.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

en la que

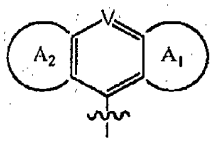
cada uno de R_1 y R_2, independientemente, es H, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo;

U es -O-, -NH-, -NH(CO)-, -NHSO-, o $-NHSO_2-$;

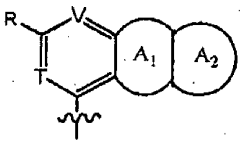
W es $-(CH_2)_m-$, $-NH(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH-$, $-O(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nO-$, $-S(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nS-$, -SO-, $-SO(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nSO-$, $-SO_2(CH_2)_n-$, o $-(CH_2)_nSO_2-$, y m es 1, 2, o 3, y n es 0, 1, o 2;

X is -O-;

Y es



o

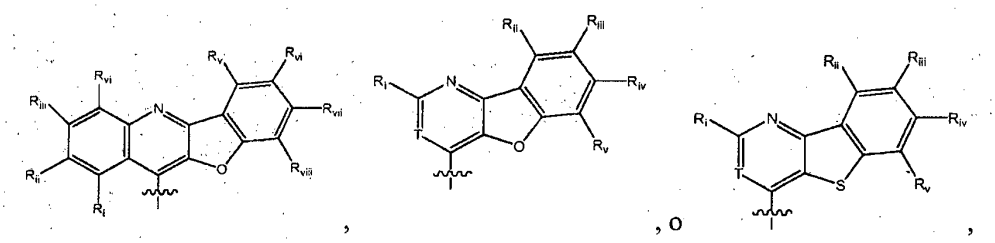


en las que cada uno de V y T, independientemente, es -CH- o -N-; R es H, halógeno, nitro, ciano, amino, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; y cada uno de A_1 y A_2, independientemente, es cicloalquilo C_{4-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con halógeno, nitro, ciano, amino, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, arilo, o heteroarilo; o está opcionalmente condensado con otro cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con halógeno, nitro, ciano, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; y

Z es -C(O), -OC(O)-, -NR'C(O)-, -OC(S)-, -NR'-C(S)-, o -OC(NH)-; en los que R' es H, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo.

2.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que W es $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$, o $-SOCH_2-$.

3.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es



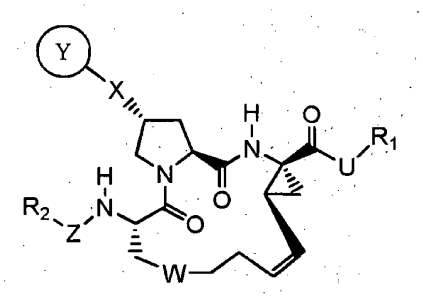
en el que cada uno de R_i, R_{ii}, R_{iii}, R_{iv}, R_v, R_{vi}, R_{vii}, y R_{viii} es, independientemente, H, halógeno, nitro, ciano, amino, alquilo C_{1-6}, alcoxilo C_{1-6}, amino, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-10}, heterocicloalquilo C_{1-10}, arilo, o heteroarilo; y T es como se define en la reivindicación 1.

4.- El compuesto de la reivindicación 3, en el que W es $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$, o $-SOCH_2-$, X es O, Z es -OC(O)-, y en el que U es opcionalmente $-NHSO_2-$.

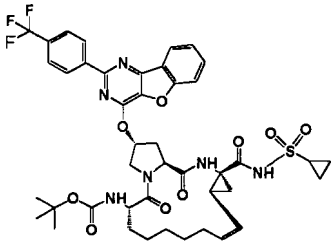
5.- El compuesto de la reivindicación 4, en el que U es $-NHSO_2-$, R_1 es ciclopropilo, y R_2 es opcionalmente alquilo C_{1-5} o cicloalquilo C_{3-8}.

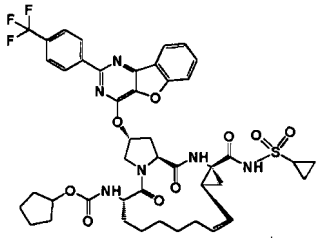
6.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que X es O, Z es -OC(O)-, U es $-NHSO_2-$, R_1 es ciclopropilo, y R_2 es alquilo C_{1-5} o cicloalquilo C_{3-8}.

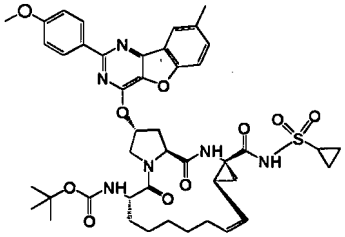
7.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la estereoquímica que aparece a continuación:

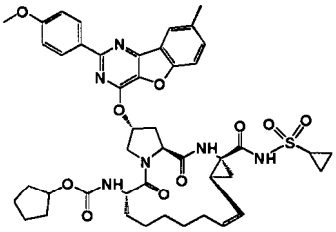


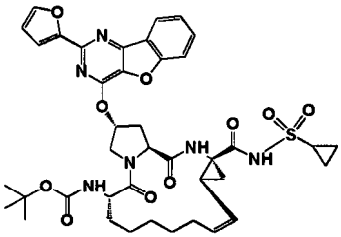
8.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es uno de los siguientes compuestos:

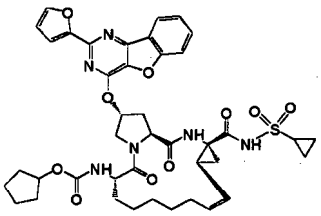


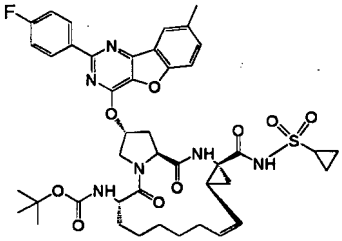


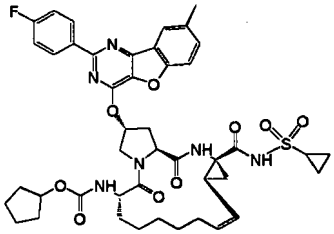


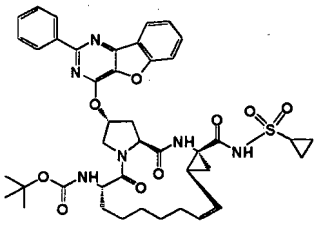


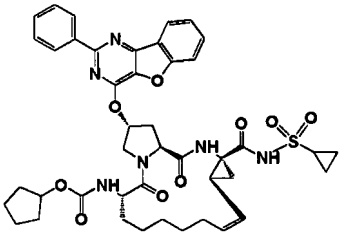


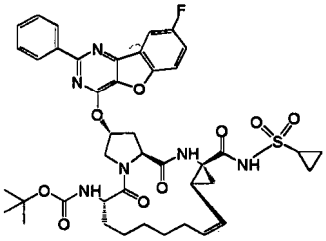


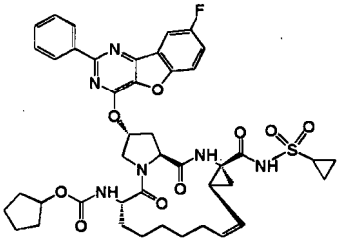


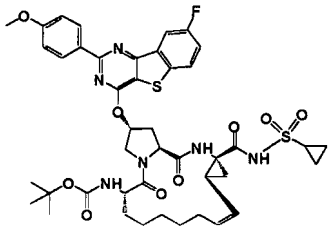


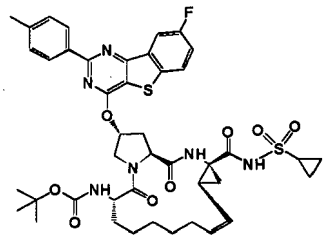


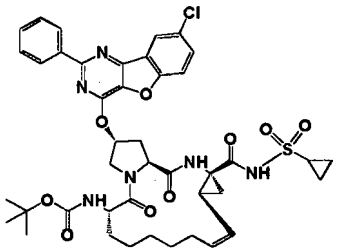


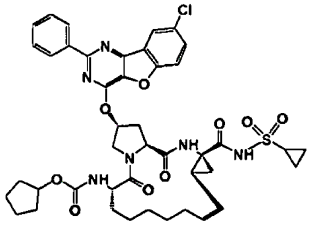


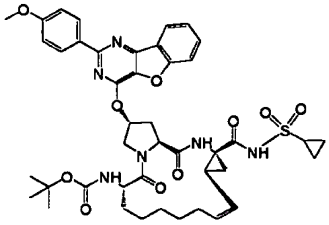


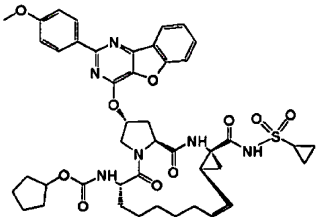


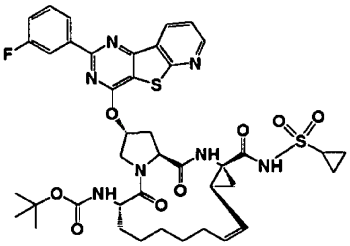


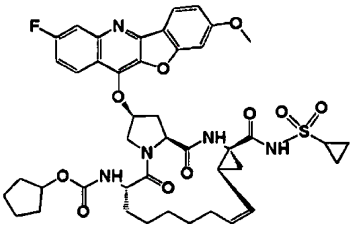


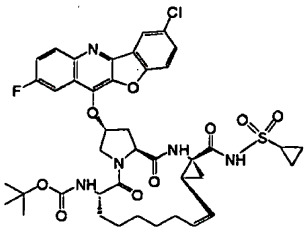


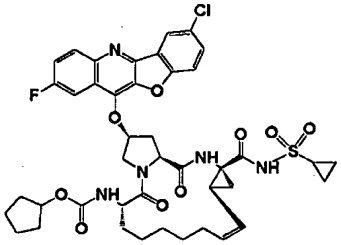


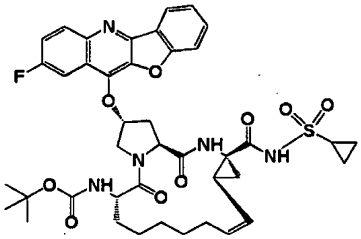


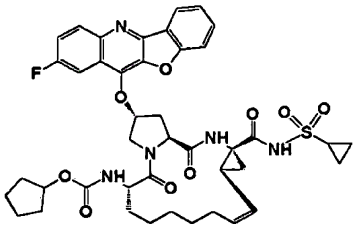


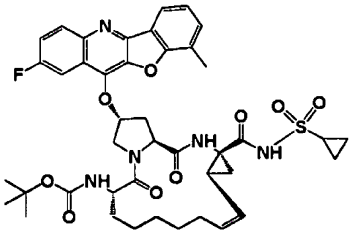


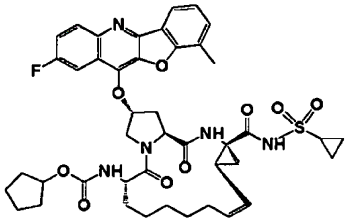


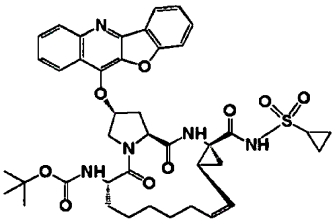


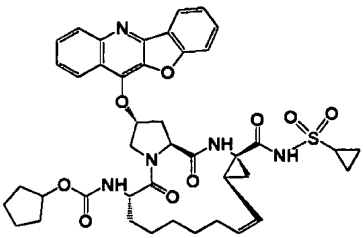


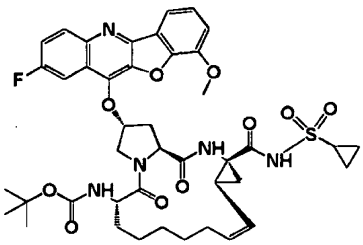


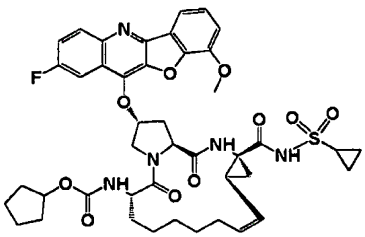


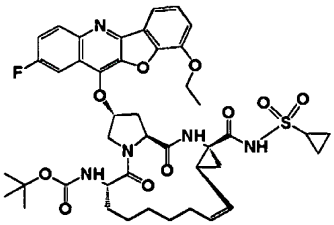


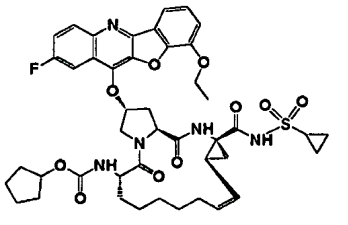


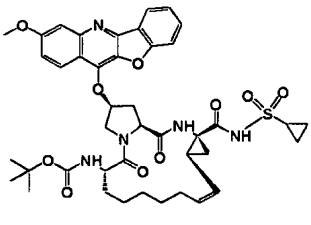


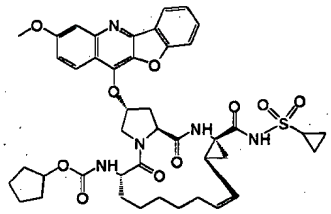


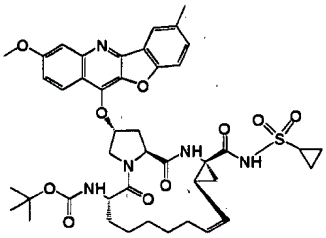


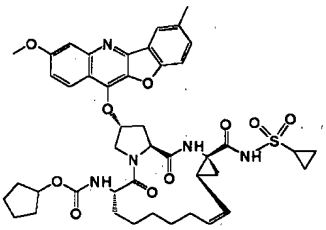


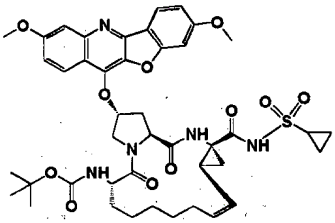


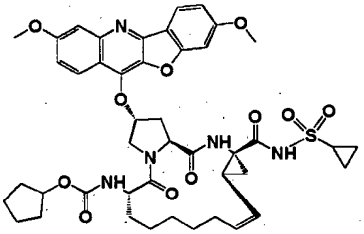


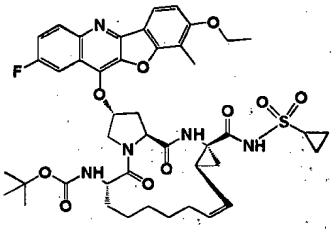


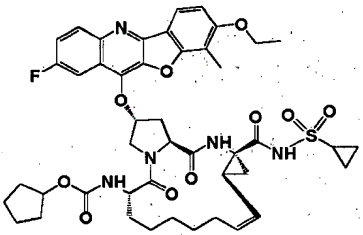


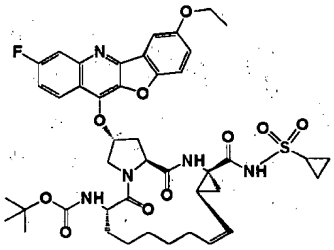


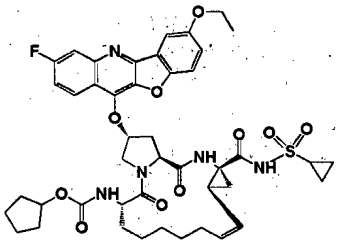


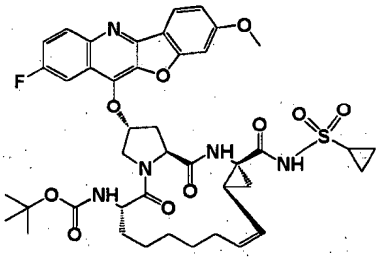


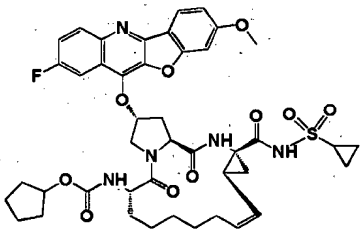


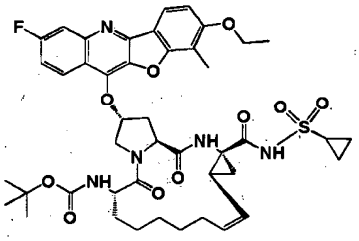


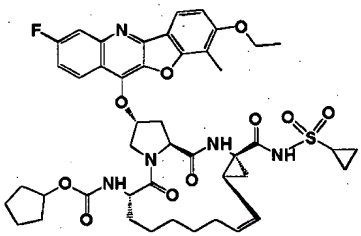


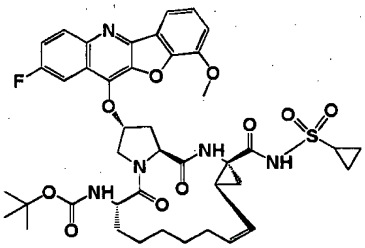


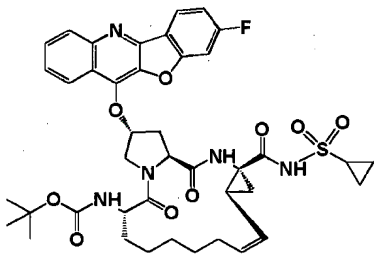


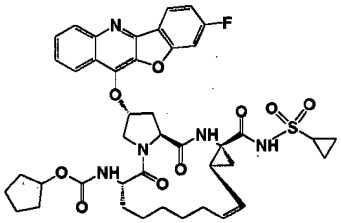


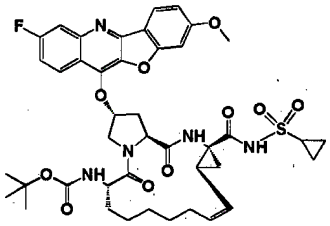


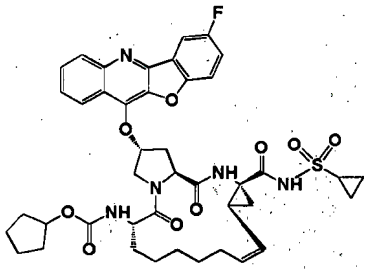


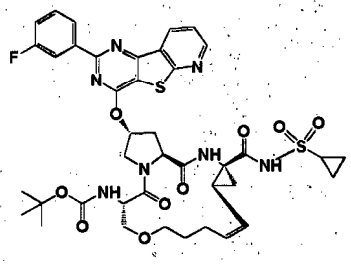


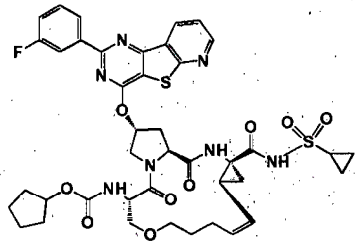


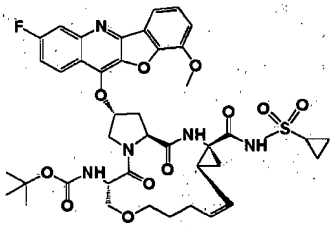


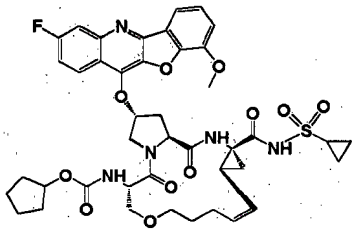


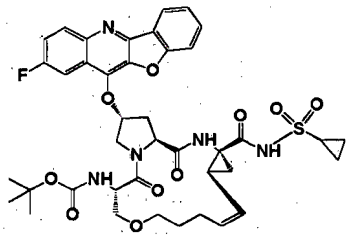


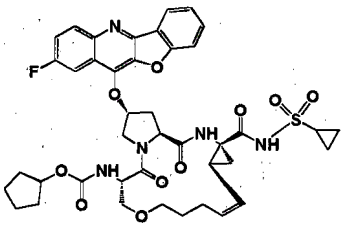


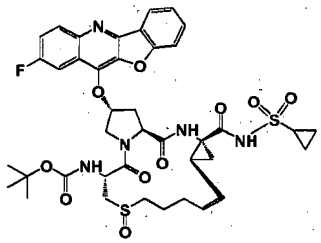












9.- Una composición farmacéutica que comprende un agente antivírico que tiene la fórmula indicada en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y que opcionalmente comprende también un agente inmunomodulador, otro agente antivírico, o un inhibidor de la NS5B polimerasa, NS5A, NS4B, o p7.

10.- Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8, para su uso para tratar una infección por el virus de la hepatitis C.