

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 295**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 12783457 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2768831**

54 Título: **Un compuesto para el tratamiento de la hepatitis C**

30 Prioridad:

20.10.2011 US 201161549450 P

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

11.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHENG, ZHIZHEN BARBARA y
D'ANDREA, STANLEY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 559 295 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

Un compuesto para el tratamiento de la hepatitis C

5 **Antecedentes de la invención**

La divulgación se refiere a (1a*R*,12b*S*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropano[d]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida (Compuesto 1, fórmula I), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, así como composiciones y el compuesto de uso como un medicamento. El compuesto tiene actividad contra el virus de la hepatitis C (VHC), y puede ser útil en el tratamiento de las personas infectadas con el VHC.

El virus de la hepatitis C (VHC) es un importante patógeno humano, y se estima que ha infectado a 170 millones de personas en todo el mundo. El virus de la hepatitis C (VHC) es la infección de transmisión sanguínea más común en EE.UU. y en todo el mundo, y es la principal causa del trasplante de hígado (Eric Chak *et al.*, "Liver International", 2011, 1090-1101). Una fracción sustancial de dichos individuos infectados por el VHC desarrollan una enfermedad hepática grave progresiva, que incluye la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (Lauer, G. M.; Walker, B. D. *N. Engl. J. Med.* 2001, 345, 41-52).

El VHC es un virus de ARN de cadena positiva. Se ha encontrado una considerable heterogeneidad en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados en el genoma del VHC. Al menos se han caracterizado seis genotipos principales, y se han descrito más de 50 subtipos, que se suman a la necesidad de nuevas terapias.

El genoma consiste aproximadamente en 9.500 nucleótidos, y tiene un solo marco de lectura abierto (ORF) que codifica una sola poliproteína grande de aproximadamente 3.000 aminoácidos. En las células infectadas, dicha poliproteína es escindida en múltiples sitios por proteasas celulares y virales para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). Las proteínas NS (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) son necesarias para la replicación del ARN viral. La NS3 es una proteasa serina que media la escisión de la poliproteína. La proteína NS4A es un cofactor para la proteasa NS3. La formación del complejo de la proteína NS3 con NS4A parece necesaria para los procesamientos, mejorando la eficacia proteolítica en todos los sitios. La proteína NS3 también muestra actividades nucleósido trifosfatasa y ARN helicasa. La NS5B (también denominada la polimerasa del VHC) es una ARN polimerasa dependiente del ARN que participa en la replicación del VHC. La ARN polimerasa dependiente del RNA NS5B (RdRp) es esencial para el ciclo de replicación del VHC (Tomei L., Altamura S., Paonessa G., *et al. Antivir Chem Chemother* 2005, 16, 225-245). La proteína NS5B del VHC se describe en "Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides" (Bressanelli; S. *et al.*, *Journal of Virology* 2002, 3482-3492; y Defrancesco y Rice, "Clinics in Liver Disease" 2003, 7, 211-242. La estructura cristalina de NS5B revela una polimerasa con forma típica de mano derecha que contiene los dominios de pulgar, palma y dedos rodeando el sitio activo (Lesburg C. A., Cable, M. B., Ferrari, *et al. Nat Struct Biol* 1999, 6, 937-943.) La NS5B es la enzima catalítica responsable de la replicación del ARN, y participa en los complejos de orden superior de las membranas lipídicas intracelulares junto con diversas proteínas y ácidos nucleicos virales, así como proteínas hospedadoras (El Hage N. y Luo G. *J Gen Virol* 2003, 84, 2761-2769. Gao L, Aizaki H, He J. W., *et al. J Virol* 2004, 78, 3480-3488). Los ejemplos de interacciones entre proteínas NS5B incluyen la unión al dominio helicasa de NS3, que facilita el desenrollamiento del ARN, y la unión a la proteína NS5A, un regulador de la replicación viral (Jennings, *et al. Biochemistry* 2008, 47, 1126-1135. McCormick C. J., Brown D., Griffin S., *et al. J Gen Virol* 2006, 87(Pt 1), 93-102).

Los inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC se pueden dividir en dos clases basándose en su modo de inhibición: inhibidores nucleósidos (NUC), que compiten con los sustratos naturales, y los inhibidores no nucleósidos (NNI), que son inhibidores alostéricos no competitivos. Tanto los inhibidores NUC como los inhibidores NNI han demostrado clínicamente tener actividad antiviral a través de la inhibición de la NS5B diana (Gelman, M. A. y J. S. Glenn (2011) "Mixing the right hepatitis C inhibitor cocktail". *Trends in Molecular Medicine* 17:1, 34-46; Soriano V., E. Vispo, E. Poveda, P. Labarga, L. Martín-Carbonero, J. V. Fernández-Montero y P. Barreiro (2011) "Directly acting antivirals against hepatitis C virus". *J Antimicrob Chemother* 66, 1673-1686). NNI evita las transiciones conformacionales de la polimerasa que son necesarias para el inicio de la síntesis del ARN (Ma H., V. Leveque, A. De Witte, W. Li, T. Hendricks, S. M. Clausen, N. Cammack, K. Klumpp. (2005) "Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and non-nucleoside inhibitors". *Virology* 332, 8-15). Los co-cristales de NNI muestran que se unen a uno de al menos tres sitios distintos en la polimerasa, en consonancia con los diversos patrones de resistencia observados para dichos inhibidores *in vitro* e *in vivo* (Beaulieu, P. (2009). "Recent advances in the development of NS5B polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection". *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 19, 145-64). Estos estudios corroboran las observaciones realizadas en el sistema de replications de ARN del VHC, en el que la inhibición de NS5B bloquea la replicación viral. (Tomei L., Altamura S., Paonessa G., *et al. Antivir Chem Chemother* 2005, 16, 225-245).

Anteriormente, el tratamiento del VHC más eficaz empleaba una combinación de interferón- α y ribavirina, conduciendo a una eficacia sostenida en solo el 40 % de los pacientes con genotipo 1 (Poynard, T. *et al. Lancet* 1998, 352, 1426-1432). Los resultados clínicos demuestran que el interferón- α PEGilado es superior al interferón- α

no modificado como monoterapia (Zeuzem, S. *et al. N. Engl. J. Med.* 2000, 343, 1666-1672). Sin embargo, incluso con regímenes terapéuticos experimentales que implican combinaciones de interferón- α PEGilado y ribavirina, una fracción importante de los pacientes no tuvo una reducción sostenida de la carga viral. En 2011, la FDA aprobó mejores tratamientos para los pacientes con genotipo 1 que incluían un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC, un antiviral de acción directa (DAA) de bajo peso molecular, más interferón y ribavirina. Se aprobaron dos inhibidores de la proteasa (INCIVEK™ (Telaprevir) y VICTRELIS™ (Boceprevir), por lo que existe una opción de fármaco para el tratamiento de combinación con interferón y ribavirina. (Ghany, M. G., D. R. Nelson, D. B. Strader, D. L. Thomas y L. B. Seeff. (2011) "An Update on Treatment of Genotype 1 Chronic Hepatitis C Virus Infection": 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 54(4): 1433-1444).

Actualmente, se están realizando importantes esfuerzos de investigación enfocados en mejorar aún más las tasas de curación, mediante la mejora de la tolerabilidad, atendiendo a las necesidades de los pacientes cuyo virus o marcadores genéticos hacen que su enfermedad sea menos sensible al tratamiento a base de interferón, y acortando la duración del tratamiento. Se están ensayando interferones con menos efectos secundarios y pautas exactas de interferón de combinaciones de DAA de bajo peso molecular. Debido a la rápida velocidad de replicación y al desarrollo de resistencia del VHC, se cree que las pautas de tratamiento serán necesariamente combinaciones de agentes.

Los pacientes infectados de hepatitis C suelen tener una larga fase asintomática (> 10 años) de la enfermedad que tiene lugar antes de la lesión hepática importante y de que se manifiesten los síntomas. Es por ello que los individuos infectados por el VHC inicialmente mantienen una alta calidad de vida o puede que ni siquiera sepan que están infectados. Dado que todos los tratamientos actualmente aprobados incluyen interferón y ribavirina, que están asociados con efectos secundarios graves, y dado que los inhibidores de la proteasa aprobados recientemente se asocian con efectos secundarios adicionales (erupción y anemia), muchos pacientes infectados por el VHC deciden retrasar el tratamiento hasta que se aprueben pautas más aceptables, lo que se espera que sea en esta década. En el futuro, los agentes que tienen efectos graves reales o percibidos, como el riesgo de causar accidentes cardiovasculares o hepatotoxicidad grave, no se utilizarán tan ampliamente para el tratamiento. Por lo tanto, la investigación actual se centra en el desarrollo de combinaciones de inhibidores seguras y eficaces que puedan ofrecer una cura para la infección por el VHC en ausencia de interferón. Se han desvelado en la técnica esfuerzos considerables dirigidos a identificar agentes antivirales de acción directa que inhiban la replicación del virus de la hepatitis C. (Gelman, M. A. y J. S. Glenn (2011) "Mixing the right hepatitis C inhibitor cocktail". *Trends in Molecular Medicine* 17:1, 34-46; Soriano V., E. Vispo, E. Poveda, P. Labarga, L. Martin-Carbonero, J. V. Fernandez-Montero y P. Barreiro (2011) "Directly acting antivirals against hepatitis C virus". *J Antimicrob Chemother* 66, 1673-1686.

La metodología general usada por las compañías farmacéuticas para identificar compuestos que se puedan usar en el tratamiento del VHC en pacientes humanos es similar a la metodología aplicada a otras dianas de descubrimiento de fármacos. La evaluación inicial de la potencia frente a la diana terapéutica (en este caso, la enzima NS5B dirigida para la inhibición de la hepatitis C) se realiza con ensayos basados en enzimas y células. Los compuestos con una potencia aceptable se perfilan en ensayos *in vitro* adicionales para evaluar su idoneidad para lograr buenos perfiles farmacocinéticos (PK) en modelos animales (roedores o especies superiores). Los ejemplos son (i) ensayos *in vitro* para evaluar la estabilidad metabólica en presencia de membranas microsomales preparadas a partir de células hepáticas de seres humanos y de otras especies; y (ii) sistemas de ensayos de permeabilidad tales como Caco-2 o PAMPA para evaluar el potencial de absorción. Los ensayos *in vitro* tales como la citotoxicidad general y la inhibición de la enzima citocromo P450 (que indica el potencial de interacciones farmacológicas) también se usan para evaluar las posibles desventajas en la seguridad.

Una gran desventaja contra la que todos los programas de descubrimiento de fármacos han desarrollado estrategias *in vitro* es la prolongación de la repolarización miocárdica y el alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma, ya que dichas propiedades se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar arritmias ventriculares potencialmente mortales, e incluso la muerte. Como es evidente, los compuestos con dicha desventaja, no serían útiles para el tratamiento de la hepatitis C. En casi todos los casos, los fármacos que aumentan el intervalo QT también bloquean un canal de potasio específico [gen relacionado con éter-a-go-go humano (hERG)] en los ensayos *in vitro*. La prolongación de la repolarización es de particular importancia, ya que se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar posteriormente arritmias ventriculares malignas, e incluso la muerte. En presencia de repolarización miocárdica prolongada, algunas personas pueden desarrollar una forma distinta de taquicardia ventricular conocida como torsades de pointes. El desarrollo de este tipo de arritmias ventriculares nuevas o más graves relacionadas con los fármacos se denomina proarritmia. Los ensayos *in vitro* habituales incluyen los ensayos del canal iónico de potasio hERG (*in silico*, flujo de alto rendimiento y electrofisiología de pinzamiento zonal) y un ensayo de potencial de acción de las fibras de Purkinje. La exploración del hERG identificará compuestos que es probable que afecten a la corriente de potasio rectificadora retardada de activación rápida cardiaca (IKr). La mayoría de los fármacos que prolongan la repolarización cardiaca lo hacen mediante el bloqueo de dicha corriente.

Para los compuestos en desarrollo clínico de los que se conocen exposiciones terapéuticas, los expertos han estimado que un margen de 30 veces o superior entre la CI_{50} de hERG y la $C_{m\acute{a}x}$ terapéutica de compuesto no unido a proteína podría bastar para protegerse de las arritmias mediadas por hERG asociadas con la prolongación del intervalo QTc; aunque Redfern *et al.* sugieren que sería prudente aumentar aún más el margen (Redfern, W. S.;

Carlsson, L.; Davis, A. S.; Lynch, W. G.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P. K. S.; Strang, I.; Sullivan, A. T.; Wallis, R.; Camm, A. J.; Hammond, T. G. "Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development". *Cardiovascular Research* (2003), 58(1), 32-45. De Bruin, M. L.; Pettersson, M.; Meyboom, R. H. B.; Hoes, A. W.; Leufkens, H. G. M. "Anti-hERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death". *European Heart Journal* (2005), 26(6), 590-597). Para la evaluación de riesgos en los programas preclínicos, en la ICH (conferencia internacional sobre la armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano) se desarrollaron algunas directrices, que también se proporcionan en el sitio Web de la FDA para orientar a la industria. Un extracto de una sección correspondiente (2.2) sobre la caracterización de compuestos preclínicos dice lo siguiente: 2.2. Estrategia S7B de la ICH: la clase química de los fármacos candidatos determina la estrategia de seguridad preclínica. El patrón de referencia para el ensayo *in vitro* de IKr es el ensayo de la interacción de hERG mediante estudios de pinzamiento zonal. El ensayo de telemetría *in vivo* permite el estudio del intervalo QT con la evaluación integrada de los riesgos. Para los estudios sobre la posible duración de la acción cardíaca (APD) *in vitro*, se requiere la preparación multicelular del corazón del animal con el fin de estudiar los posibles efectos adversos de los fármacos candidatos en el conjunto de los canales iónicos cardíacos abiertos por la tensión.

Para la evaluación *in vitro*, también se usa el patrón de referencia (ensayo de pinzamiento zonal) para cumplir con las recomendaciones normativas de la FDA (ensayo de hERG). Sin embargo, dicho ensayo tiene un bajo rendimiento, y se usan los ensayos *in silico* y de flujo de alto rendimiento (FLIPR) para la exploración inicial de un mayor número de compuestos. Los resultados de flujo (FLIPR) se validan con el ensayo de pinzamiento zonal.

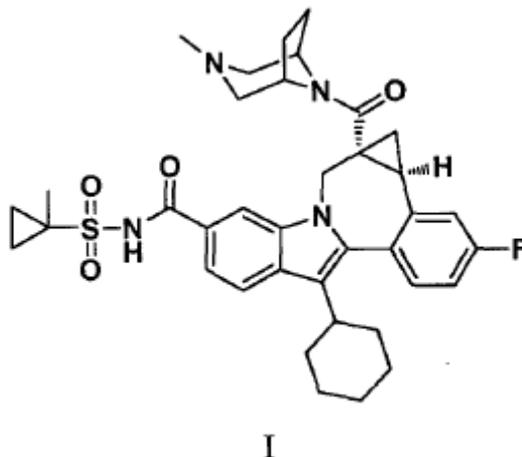
Debido a la laboriosidad y al alto coste de las evaluaciones *in vivo* tales como la telemetría en animales, estas se emplean exclusivamente para los compuestos de interés de entre el perfil total de compuestos. Estos son compuestos para los que los ensayos *in vitro* sugieren que existe una alta probabilidad de que puedan seguir avanzando si se continúa con el perfilado. Como alternativa, los compuestos usados para proporcionar un punto de referencia para validar ensayos *in vitro* se pueden evaluar *in vivo*. Esto también es válido para estudios *in vitro* de APD avanzados. El ensayo de las fibras de Purkinje también es de bajo rendimiento, y complementa al ensayo de hERG mediante la evaluación de todas las corrientes iónicas principales que contribuyen al potencial de acción cardíaco. Las señales para los efectos sobre otras corrientes iónicas cardíacas se pueden detectar en este ensayo de potencial de acción y tener un seguimiento en los estudios de pinzamiento zonal sobre los canales iónicos cardíacos candidatos (por ejemplo, canales de Na, de Ca u otros canales de K tales como Iks).

Hay una serie de compuestos que son inhibidores de la NS5B del VHC en desarrollo clínico o que han avanzado a los estudios clínicos, y que se han interrumpido por varias razones. Más concretamente, los inhibidores de NS5B del VHC que se unen a un sitio denominado en la técnica Sitio 1 se han desvelado en las patentes de Estados Unidos N° 7.399.758 y 7.485.633, y la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N° 2009130057.

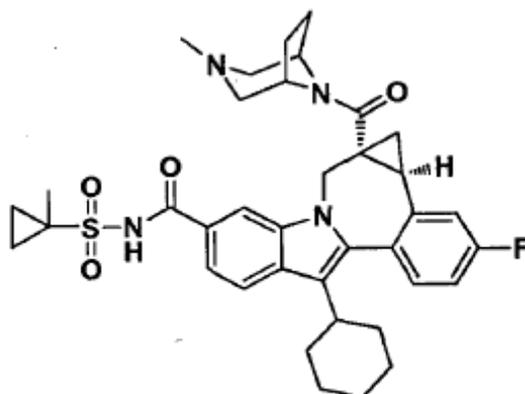
El nuevo compuesto de la presente invención que está englobado por la definición de la Fórmula I de la publicación de solicitud de Estados Unidos 2009130057 no se desvela ni se describe en dicha solicitud. Sorprendentemente, se ha descubierto que la (2*R*)-2-[[[4-clorofenil)sulfonyl][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida posee atributos únicos que la hacen útil para el tratamiento de la hepatitis C.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a (1*aR*, 12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida que tiene la Fórmula I, sus formulaciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de la hepatitis C.



Un aspecto de la invención es el compuesto (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



I

5 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o un adyuvante, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida y un compuesto que tiene actividad contra el VHC.

15 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en la que el compuesto que tiene actividad contra el VHC es un interferón. Otro aspecto de la invención es aquel en el que el interferón se selecciona entre interferón α 2B, interferón α PEGilado, interferón de consenso, interferón α 2A e interferón τ linfoblastoide.

20 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en la que el compuesto que tiene actividad contra el VHC es una ciclosporina. Otro aspecto de la invención es aquel en el que la ciclosporina es ciclosporina A.

30 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en la que el compuesto que tiene actividad contra el VHC se selecciona del grupo que consiste en interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina-5'-monofosfato-deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.

35 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en la que el compuesto que tiene actividad contra el VHC es eficaz en la inhibición de la función de una diana seleccionada entre metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC, IMPDH y un análogo nucleósido para el tratamiento de la infección por el VHC.

45 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un interferón y ribavirina.

Otro aspecto de la invención es el compuesto (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-

carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de una infección por el VHC. En otra realización, el compuesto es eficaz en la inhibición de la función del replicón del VHC. En otra realización, el compuesto es eficaz en la inhibición de la función de la proteína NS5B del VHC.

- 5 Otro aspecto de la invención es un compuesto, o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC para su uso en una infección por el VHC. Otro aspecto de la invención es el compuesto, o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que el otro compuesto que tiene actividad contra el VHC es un interferón. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que el interferón se selecciona entre interferón α 2B, interferón α PEGilado, interferón de consenso, interferón α 2A y interferón τ linfoblastoide. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-5(3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que el otro compuesto que tiene actividad contra el VHC es una ciclosporina. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que la ciclosporina es ciclosporina A. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que el otro compuesto que tiene actividad contra el VHC se selecciona entre interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN de interferencia, ARN antisentido, Imiqimod, ribavirina, un inhibidor de inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC, en el que el otro compuesto que tiene actividad contra el VHC es eficaz en la inhibición de la función de una diana seleccionada del grupo que consiste en metaloproteasa del VHC, serina proteasa del VHC, polimerasa del VHC, helicasa del VHC, proteína NS4B del VHC, entrada del VHC, ensamblaje del VHC, salida del VHC, proteína NS5A del VHC, IMPDH y un análogo nucleósido para el tratamiento de la infección por el VHC. Otro aspecto de la invención es el compuesto o una (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonil)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida, en combinación con (antes, después o simultáneamente) otro compuesto que tiene actividad contra el VHC en el que el otro compuesto que tiene actividad contra el VHC es eficaz en la inhibición de la función de una diana del ciclo de vida del VHC distinta de la proteína NS5B del VHC.
- 45 La invención incluye todas las formas de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas en las que los contraiones no contribuyen significativamente a la actividad fisiológica ni a la toxicidad de los compuestos y, como tales, funcionan como equivalentes farmacológicos. Dichas sales se pueden preparar de acuerdo con técnicas orgánicas comunes que emplean reactivos disponibles en el mercado. Algunas formas de sales aniónicas incluyen acetato, acistrato, besilato, bromuro, camsilato, cloruro, citrato, fumarato, glucouronato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, yoduro, lactato, maleato, mesilato, nitrato, pamoato, fosfato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y xinofoato. Algunas formas de sales catiónicas incluyen amonio, aluminio, bismuto, calcio, colina, dietilamina, dietanolamina, litio, magnesio, meglumina, 4-fenilciclohexilamina, piperazina, potasio, sodio, trometamina y cinc.
- 55 Como el compuesto de la presente invención posee átomos de carbono asimétricos, la presente invención incluye las formas estereoisoméricas del compuesto de Fórmula I. El uso de una sola designación tal como (*R*) o (*S*) pretende incluir, en su mayoría, un estereoisómero. Las mezclas de isómeros se pueden separar en isómeros individuales de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, cristalización fraccionada, cromatografía de adsorción u otros procedimientos de separación adecuados. Los racematos resultantes se pueden separar en antípodas de la manera habitual, tras la introducción de grupos formadores de sales adecuados, por ejemplo, mediante la formación de una mezcla de sales diastereoisoméricas con agentes formadores de sales ópticamente activos, separando la mezcla en sales diastereoisoméricas y convirtiendo las sales separadas en los compuestos libres. Las formas enantioméricas también se pueden separar por fraccionamiento a través de columnas quirales de cromatografía líquida de alta presión.
- 65 La invención pretende incluir todos los isótopos de átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos

incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico, pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos del hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos del carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos de la invención marcados isotópicamente se pueden preparar, en general, mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o mediante procesos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado en otros casos. Dichos compuestos pueden tener varios posibles usos, por ejemplo, como patrones y reactivos para determinar la actividad biológica. En el caso de los isótopos estables, dichos compuestos pueden tener el potencial de modificar favorablemente las propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

"Terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de agente requerida para proporcionar un beneficio significativo al paciente según lo entendido por los profesionales del campo de la hepatitis y de la infección por el VHC.

"Paciente" significa una persona infectada con el virus VHC e idónea para el tratamiento según lo entendido por los profesionales del campo de la hepatitis y de la infección por el VHC.

Los términos "tratamiento", "terapia" y "régimen", y la expresión "infección por el VHC," y expresiones y términos relacionados, se usan según lo entendido por los expertos del campo de la hepatitis y de la infección por el VHC.

Los agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con el compuesto de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en las cantidades indicadas en el Vademécum (PDR), cuando proceda, o según lo determinado de otra manera por un experto habitual en la materia. Sin embargo, se entenderá que la cantidad de compuesto realmente administrada será determinada por un médico a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se vaya a tratar, la elección del compuesto que se vaya a administrar, la vía de administración seleccionada, la edad, el peso y la respuesta de cada paciente y la gravedad de los síntomas del paciente.

Para un uso terapéutico, el compuesto farmacológicamente activo de Fórmula I normalmente se administrará como una composición farmacéutica que comprenderá como el (o un) principio activo esencial al menos uno de dichos compuestos junto con un vehículo sólido o líquido farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, con adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables empleando técnicas convencionales.

Las composiciones farmacéuticas incluyen formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intradérmica e intravenosa), transdérmica, sublingual, bronquial o nasal. Por lo tanto, si se usa un vehículo sólido, la preparación puede ser en comprimidos, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o de microgránulo, o en forma de un trocisco o de una pastilla. El vehículo sólido puede contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes de formación de comprimidos, disgregantes y agentes humectantes. Si se desea, el comprimido se puede recubrir con una película mediante técnicas convencionales. Los preparados orales incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, a escala, hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos mezclados con una carga o aglutinantes tales como lactosa o almidones; lubricantes tales como talco o estearato de magnesio; y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como aceites grasos, líquidos, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores. Si se emplea un vehículo líquido, el preparado puede estar en forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, vehículo estéril para inyección, suspensión líquida acuosa o no acuosa, o puede ser un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Los preparados líquidos pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes humectantes, vehículo no acuoso (incluyendo aceites comestibles), conservantes, así como agentes aromatizantes y/o colorantes. Para la administración parenteral, un vehículo normalmente comprenderá agua estéril, al menos en gran parte, aunque se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones de glucosa. También se pueden usar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear agentes de suspensión convencionales. También se pueden añadir conservantes convencionales y agentes de tamponamiento a las formas farmacéuticas parenterales. Para la administración tópica o nasal, en la formulación, se usan agentes penetrantes o de penetración apropiados para la barrera que se desee atravesar. Dichos agentes penetrantes son conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas se preparan mediante técnicas convencionales apropiadas para el preparado deseado que contiene cantidades apropiadas del principio activo, es decir, del compuesto de Fórmula I de acuerdo con la invención. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA, 17^a edición, 1985.

La invención también engloba el compuesto para su uso en terapia de combinación. Es decir, el compuesto se puede usar en combinación con, pero por separado de, otros agentes útiles en el tratamiento de la hepatitis y la infección por VHC. En dichos métodos de combinación, en general, el compuesto se administrará a una dosis diaria de 1-100 mg/kg de peso corporal en combinación con otros agentes. Por lo general, el resto de agentes se administrarán en las cantidades usadas terapéuticamente. No obstante, la pauta de dosificación específica será determinada por un médico según su criterio.

En la Tabla 1, se enumeran algunos ejemplos de compuestos adecuados para las composiciones y los métodos.

Tabla 1

<i>Nombre comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Compañía suministradora</i>
NIM811		Inhibidor de cicfilina	Novartis
Zadaxin		Inmunomodulador	Sciclone
Suvus		Azul de metileno	Bioenvision
Actilon (CPG10101)		Agonista de TLR9	Coley
Batabulin (T67)	Anticancerígeno	Inhibidor de β -tubulina	Tularik Inc., South San Francisco, CA
ISIS 14803	Antiviral	Antisentido	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., Nueva York, NY
Summetrel	Antiviral	antiviral	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
GS-9132 (ACH-806)	Antiviral	Inhibidor del VHC	Achillion/Gilead
Compuestos de pirazolopirimidina y sales del documento WO-2005047288, 26 de mayo de 2005	Antiviral	Inhibidores del VHC	Arrow Therapeutics Ltd.
Levovirin	Antiviral	Inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Merimepodib (VX-497)	Antiviral	Inhibidor de IMPDH	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
XTL-6865 (XTL-002)	Antiviral	Anticuerpo monoclonal	XTL Biopharmaceutica Is Ltd., Rehovot, Isreal
Telaprevir (VX-950, LY-570310)	Antiviral	Inhibidor de la serina proteasa NS3	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA/ Eli Lilly and Co. Inc., Indianapolis, IN
VHC-796	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Wyeth/Virophanna
NM-283	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Idenix/Novartis
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Gene Labs/Novartis
GL-60667	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Gene Labs/Novartis
2'C MeA	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Gilead
PSI6130	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Roche
R1626	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Roche
2'C Metil-adenosina	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Merck
JTK-003	Antiviral	Inhibidor de RdRp	Japan Tobacco Inc., Tokyo, Japón
Levovirin	Antiviral	Ribavirina	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
Ribavirin	Antiviral	Ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Viramidine	Antiviral	Profármaco de ribavirina	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	Antiviral	Ribozima	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO

ES 2 559 295 T3

BILN-2061	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Boehringer Ingelheim Pharm KG, Ingelheim, Alemania
SCH 503034	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Schering Plough
Zadazim	Inmunomodulador	Inmunomodulador	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Mateo, CA
Ceplene	Inmunomodulador	Inmunomodulador	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
CellCept	Inmunosupresor	Inmunosupresor de IgG del VHC	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
Civacir	Inmunosupresor	Inmunosupresor de IgG del VHC	Nabi Biophannaceutica Is Inc., Boca Raton, FL
Albuferon- α	Interferón	IFN- α 2b de albúmina	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Infergen A	Interferón	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
Omega IFN	Interferón	IFN- ω	Intarcia Therapeutics
IFN- β y EMZ701	Interferón	IFN- β y EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canadá
Rebif	Interferón	IFN- β 1a	Serono, Geneva, Suiza
Roferon A	Interferón	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
Intron A	Interferón	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Intron A y Zadaxin	Interferón	IFN- α 2b/ α 1-timosina	RegeneRx Biopharma. Inc., Bethesda, MD/ SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA
Rebetron	Interferón	IFN- α 2b/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Actimmune	Interferón	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
Interferon- β	Interferón	Interferón- β -1a	Serono
Multiferon	Interferón	IFN de larga duración	Viragen/ Valentis
Wellferon	Interferón	IFN- α n1 linfoblastoide	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, RU
Omniferon	Interferón	IFN- α natural	Viragen Inc., Plantation, FL
Pegasys	Interferón	IFN- α 2a PEGilado	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
Pegasys y Ceplene	Interferón	IFN- α 2a PEGilado/ inmunomodulador	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Pegasys y Ribavirin	Interferón	IFN- α 2a PEGilado/ribavirina	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Suiza
PEG-Intron	Interferón	IFN- α 2b PEGilado	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intron/Ribavirin	Interferón	IFN- α 2b PEGilado/ribavirin	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
IP-501	Protección hepática	antifibrótico	Indevis Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
IDN-6556	Protección hepática	Inhibidor de caspasa	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
ITMN-191 (R-7227)	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa de NS5B	Genelabs
ANA-971	Antiviral	Agonista de TLR-7	Anadys

Boceprevir	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Schering Plough
TMS-435	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Tibotec BVBA, Mechelen, Belgium
BI-201335	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Alemania
MK-7009	Antiviral	Inhibidor de serina proteasa	Merck
PF-00868554	Antiviral	Inhibidor de replicasa	Pfizer
ANA598	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B no nucleósido	Anadys Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, EE.UU.
IDX375	Antiviral	Inhibidor de la replicasa no nucleósido	Idenix Pharmaceuticals, Cambridge, MA, EE.UU.
BILB 1941	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B	Boehringer Ingelheim Canada Ltd R&D, Laval, QC, Canadá
PSI-7851	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa no nucleósido	Pharmasset, Princeton, NJ, EE.UU.
PSI-7977	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B nucleósido	Pharmasset, Princeton, NJ, EE.UU.
VCH-759	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B	ViroChem Pharma
VCH-916	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B	ViroChem Pharma
GS-9190	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa de NS5B	Gilead
Peg-interferon lamda	Antiviral	Interferón	ZymoGenetics/ Bristol-Myers Squibb

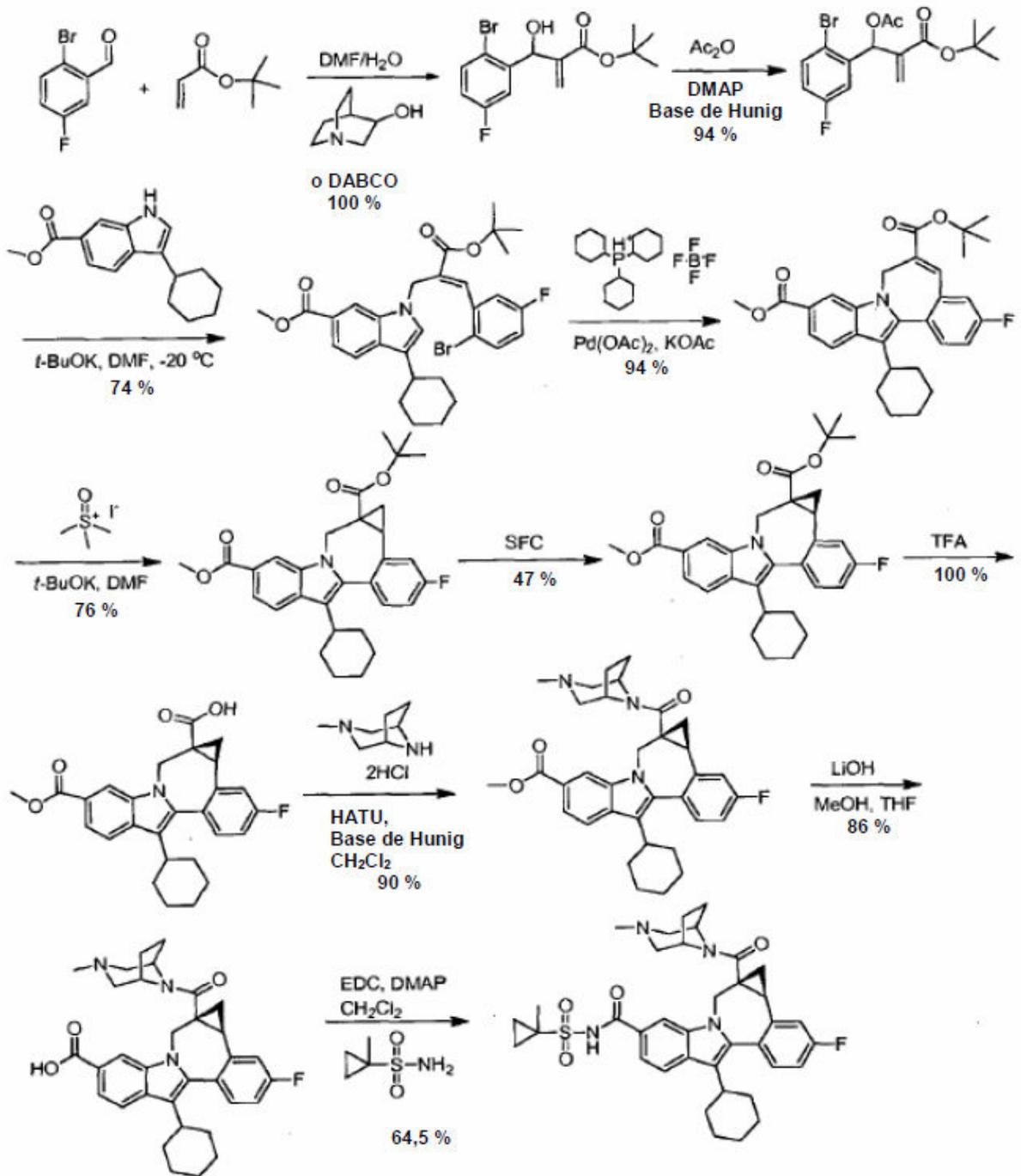
Métodos de síntesis

5 En el Esquema 1, se muestra una ruta de preparación del Compuesto 1. Dicha ruta utiliza metodologías químicas de acoplamiento cruzado con paladio y de Bayliss-Hillman. Una reacción de Bayliss-Hillman proporcionó el éster insaturado. En dicha etapa inicial, se puede utilizar DABCO o (4S)-quinuclidin-3-ol como base. El hidroxilo se acetiló para proporcionar el acetato. La adición de conjugado del indol en condiciones básicas proporcionó el precursor de la ciclación, que fue el sustrato para una reacción de acoplamiento cruzado de paladio que dio el ciclohepteno. El uso de iluro de dimetilsulfoxonio proporcionó el ciclopropano racémico. Dicho compuesto se resolvió mediante cromatografía quiral SFC. Dicha separación era adaptable a escalas mayores tales como > 100 g. El éster *terc*-butílico se trató con TFA en CH₂Cl₂, dando el ácido, que se aisló como producto en bruto tras la eliminación de CH₂Cl₂ y TFA. El ácido en bruto se acopló con sal bis-HCl de (1*R*, 5*S*)-3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano en CH₂Cl₂ en presencia de HATU y base de Hunig, proporcionando la amida tras la purificación a través de cromatografía en columna. La hidrólisis con LiOH en una mezcla de MeOH y THF produjo el penúltimo compuesto tras el tratamiento de extracción y trituración con CH₂Cl₂. El acoplamiento final del ácido con 1-metilciclopropano-1-sulfonamida facilitado por EDC y DMAP proporcionó el Compuesto 1. El material obtenido mediante purificación por cromatografía en columna contenía disolvente residual de CH₂Cl₂ al ~ 3 %, que fue difícil de retirar bajo un alto vacío a 80 °C. El CH₂Cl₂ se eliminó disolviendo repetidamente API en MeOH y evaporando, y con secado final a alto vacío a 60 °C durante 24 h.

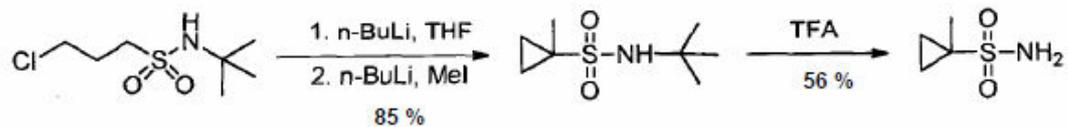
20 La 1-metilciclopropano-1-sulfonamida intermedia se preparó basándose en un método publicado anteriormente (Synlett 2006, 5, 725-278) (Esquema 2). La *N*-(*terc*-butil)-1-metilciclopropano-1-sulfonamida se sintetizó usando un procedimiento de un solo recipiente a partir de *N*-(*terc*-butil)-3-cloropropano-1-sulfonamida a través de ciclación intramolecular potenciada por *n*-BuLi, litación y alquilación con yoduro de metilo. La eliminación del grupo protector Boc con TFA proporcionó 1-metilciclopropano-1-sulfonamida.

25

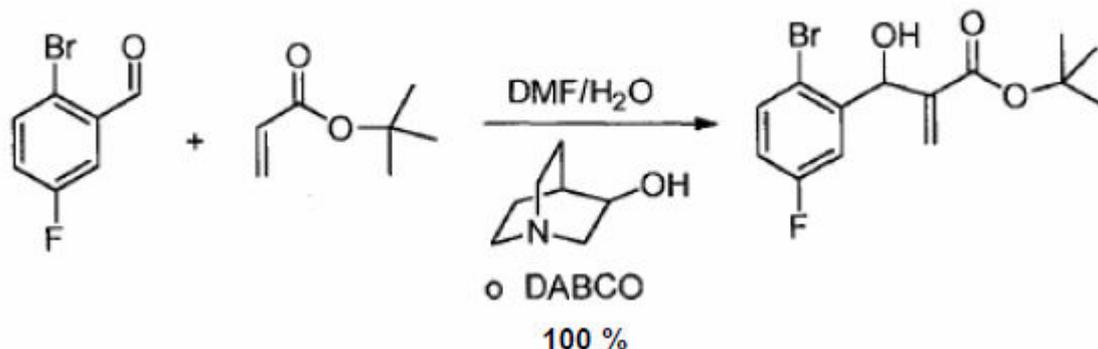
Esquema 1



Esquema 2



Preparación 1

2-((2-Bromo-5-fluorofenil)(hidroxi)metil)acrilato *tert*-butílico

5

En un matraz de 1 l, se añadió 2-bromo-5-fluorobenzaldehído (10,0 g, 49,3 mmol), (4S)-quinuclidin-3-ol (6,26 g, 49,3 mmol) en DMF (28 ml) y agua (12 ml). A esta mezcla de reacción, se añadió acrilato *tert*-butílico (14,3 ml, 99,0 mmol). Después, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 19 h. En este momento, la LCMS indicó el consumo de los materiales de partida. Se diluyó la mezcla de reacción con éter (500 ml) y se separaron las capas. Se extrajo la capa acuosa dos veces con éter (200 ml cada vez). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl 0,1 N, agua y salmuera. Después se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron, produciendo 18,0 g (> 100 %) del producto en forma de un aceite amarillo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (dd, *J* = 8,8; 5,3 Hz, 1H), 7,32 (dd, *J* = 9,7; 3,1 Hz, 1H), 6,93 (ddd, *J* = 8,7; 7,7; 3,1 Hz, 1H), 6,29 (s, 1H), 5,85 (s, 1H), 5,52 (t, *J* = 1,1 Hz, 1H), 1,50 (s, 9H). LCMS: (Tr = 2,06 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente B del 0 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H + 23) = 355,09.

10

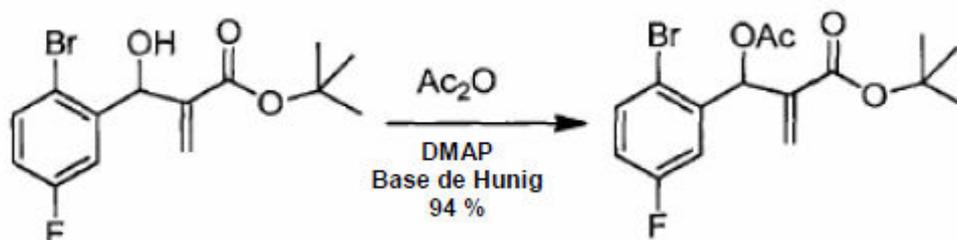
15

Preparación alternativa. Este procedimiento usa DABCO como un sustituto más económico del (4S)-quinuclidin-3-ol. Se cargó un matraz de 1 l con 2-bromo-5-fluorobenzaldehído (13,4 g, 66,0 mmol), DABCO (14,81 g, 132 mmol), DMF (53,6 ml) y agua (13,4 ml). A esta mezcla de reacción, se añadió acrilato *tert*-butílico (12,68 g, 99,0 mmol). Después, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h. En este momento, la TLC indicó el consumo del material de partida. Se diluyó la mezcla de reacción con 25 ml de agua y después se extrajo con dos porciones de 100 ml de MTBE. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl 0,1 N, agua y salmuera. Después se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron, produciendo 25 g (> 100 %) del producto en forma de un aceite incoloro que se usó sin purificación adicional.

20

25

Preparación 2

2-(Acetoxi(2-bromo-5-fluorofenil)metil)acrilato *tert*-butílico

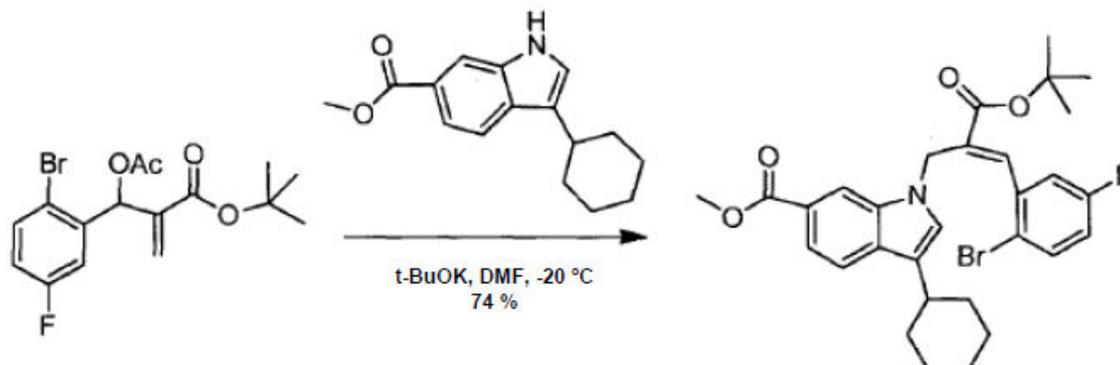
30

A una mezcla del material de partida hidroxilado (18 g, 54,4 mmol) en DCM (500 ml), se añadió anhídrido acético (6,15 ml, 65,2 mmol), base de Hunig (12,3 ml, 70,7 mmol) y DMAP (0,066 g, 0,54 mmol). Se agitó esta mezcla a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró al vacío. El residuo se diluyó con éter (500 ml) y se lavó con HCl 0,1 N, agua y salmuera. A continuación, se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío, produciendo 19 g (94 %) del acetato en forma de un aceite amarillo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,57 (dd, *J* = 8,8; 5,3 Hz, 1H), 7,09 (dd, *J* = 9,3; 3,0 Hz, 1H), 6,96 (ddd, *J* = 8,8; 7,8; 3,0 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H), 6,45-6,41 (m, 1H), 5,54-5,49 (m, 1H), 2,18-2,15 (s, 3H), 1,47-1,43 (s, 9H). LCMS: (Tr = 1,46 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 60 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H + 23) = 397,08.

35

40

Preparación 3

1-(3-(2-Bromo-5-fluorofenil)-2-(*tert*-butoxicarbonil)alil)-3-ciclohexil-1*H*-indol-6-carboxilato (*E*)-metílico

5

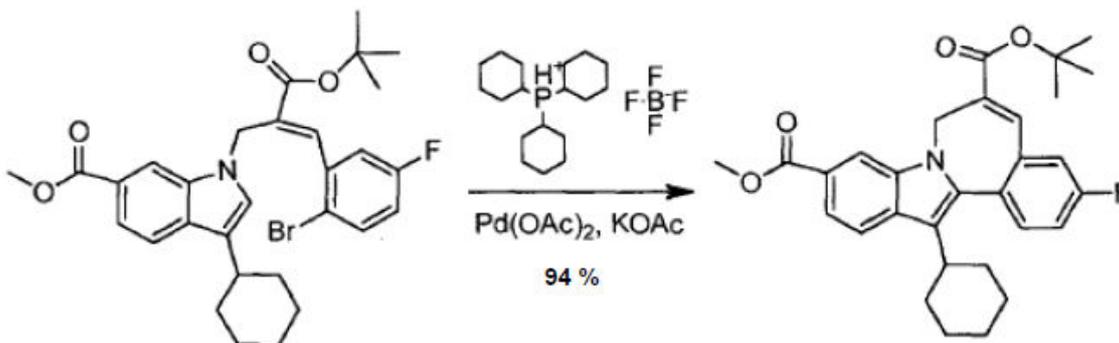
A un matraz de 500 ml, se añadió el éster (4,27 g, 16,6 mmol) y DMF (100 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que se logró la disolución completa. Se añadió *tert*-butóxido potásico sólido (16,6 ml, 16,6 mmol) durante un período de 5 min. Durante esta adición, la solución incolora se volvió de un color amarillo azulado. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se enfrió hasta -47 °C (baño de acetonitrilo/hielo seco). Se añadió una solución de 2-(acetoxi(2-bromo-5-fluorofenil)metil)acrilato *tert*-butílico (6,2 g, 16,61 mmol) en DMF (20 ml), que provocó la reacción a su vez a un color rojo. Se mantuvo la temperatura a -40 a -45 °C durante 1 h y después se calentó hasta -20 °C durante un período de 2 h. La solución se volvió de un color castaño claro. Se inactivó cuidadosamente la mezcla de reacción con agua helada manteniendo la temperatura por debajo de -15 °C. Se diluyó la mezcla resultante con EtOAc, proporcionando una fase orgánica y acuosa. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando 8,0 g del producto en bruto en forma de un sólido de color castaño claro. A continuación, se trituró con MeOH, aislándose 7 g (74 %) del producto en forma de un sólido blanco. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78-7,83 (m, 2H), 7,75 (dd, *J* = 1,25; 8,28 Hz, 1H), 7,58-7,64 (m, 2H), 6,89-7,00 (m, 3H), 5,02 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 2,73-2,85 (m, 1H), 2,04 (d, *J* = 11,04 Hz, 2H), 1,75-1,90 (m, 3H), 1,38-1,50 (m, 5H), 1,37 (s, 9H). LCMS: (Tr = 0,56 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 100 %, disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 572,27.

10

15

20

Preparación 4

25 13-Ciclohexil-3-fluoro-7*H*-indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-6,10-dicarboxilato de 10-metil-6-(2-metil-2-propanilo)

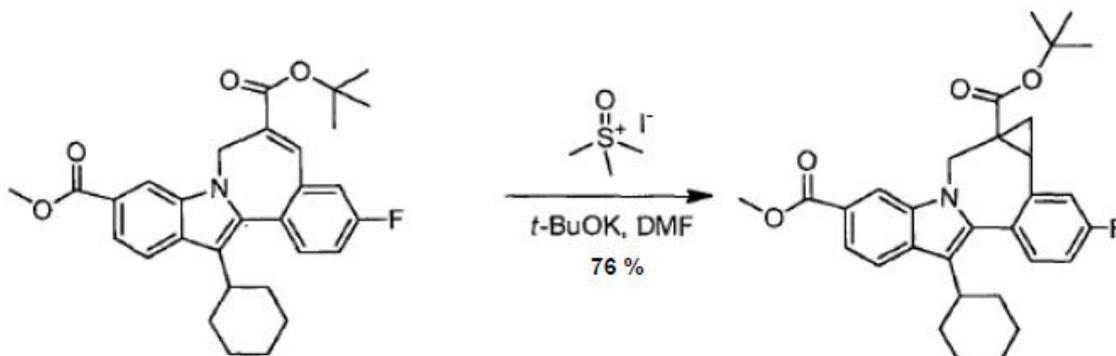
Se dispuso una mezcla de material de partida (13,0 g, 22,8 mmol), Pd(OAc)₂ (0,256 g, 1,14 mmol), acetato de potasio (7,83 g, 80,0 mmol), tetrafluoroborato de triciclohexilfosfonio (0,629 g, 1,71 mmol) en *N,N*-dimetilacetamida (50 ml) bajo una atmósfera de N₂ (vacío/recarga de N₂ durante 3 veces). A continuación, se calentó hasta 122 °C durante 6 h. La mezcla de reacción se volvió de color amarillo oscuro/marrón, produciéndose un cierto precipitado sólido negro. Se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (800 ml). Después, se lavó la mezcla con agua (3 veces), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío, produciendo 12 g de un sólido de color amarillo. El sólido se trituró con hexano para dar 10,5 g (94 %) del producto como un sólido amarillo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 8,5; 1,5 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,60 (dd, *J* = 8,5; 5,8 Hz, 1H), 7,24 (td, *J* = 9,0; 2,8 Hz, 2H), 5,77-5,55 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 2,88-2,77 (m, 1H), 2,19-1,33 (m, 10H), 1,66 (s, 9H). LCMS: (Tr = 0,66 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 100 %, disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 490,35.

35

40

Preparación 5

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1,12b-dihidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-1*a*,5(2*H*)-dicarboxilato de 5-metil-1*a*-(2-metil-2-propanilo)



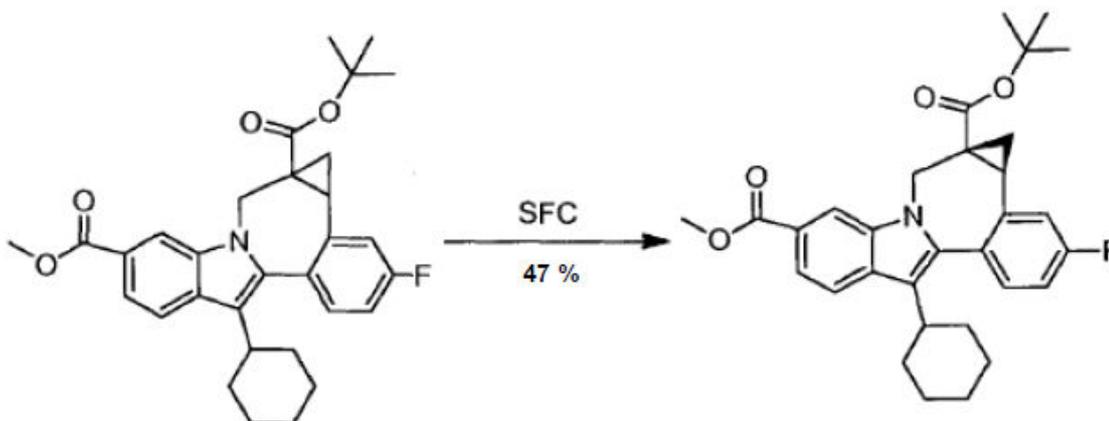
5

A una mezcla de yoduro de trimetilsulfoxonio (1,68 g, 7,64 mmol) en DMF (10 ml), se añadió *tert*-butóxido potásico (7,64 ml, 7,64 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió el material de partida (3,4 g, 6,94 mmol) a la mezcla de reacción y se siguió agitando durante otra 2 h. Se formó un precipitado de color castaño. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción, y el sólido blanquecino resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. Se secó este producto en bruto al vacío, obteniéndose 2,9 g de un sólido blanquecino que se trituró con hexano, dando 2,7 g del producto de diéster racémico en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (rotámeros) δ 8,32 (d, $J = 1,0$ Hz, 0,5 H), 8,17 (s, 0,5H), 7,91-7,84 (m, 1H), 7,81-7,73 (m, 1H), 7,38-7,29 (m, 1,5H), 7,24 (dd, $J = 9,7$; 2,6 Hz, 0,5 H), 7,09 (tt, $J = 8,3$; 2,5 Hz, 1H), 5,45 (d, $J = 15,6$ Hz, 0,5 H), 5,18 (d, $J = 15,3$ Hz, 0,5 H), 4,06 (d, $J = 15,1$ Hz, 0,5 H), 3,99 (s, 1,5H), 3,97 (s, 1,5H), 3,43 (d, $J = 15,1$ Hz, 0,5H), 2,96-2,86 (m, 1H), 2,83-2,73 (m, 0,5H), 2,59 (dd, $J = 10,0$; 6,8 Hz, 0,5 H), 2,18-1,27 (m, 11H), 1,55 (s, 4,5H), 1,31 (s, 4,5H), 1,16 (dd, $J = 6,0$; 4,3 Hz, 0,5 H), 0,37 (t, $J = 6,1$ Hz, 0,5 H). LCMS: (Tr = 0,57 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 100 %, disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 504,39.

20

Preparación 6

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1,12b-dihidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-1*a*,5(2*H*)-dicarboxilato de 5-metil-1*a*-(2-metil-2-propanilo)



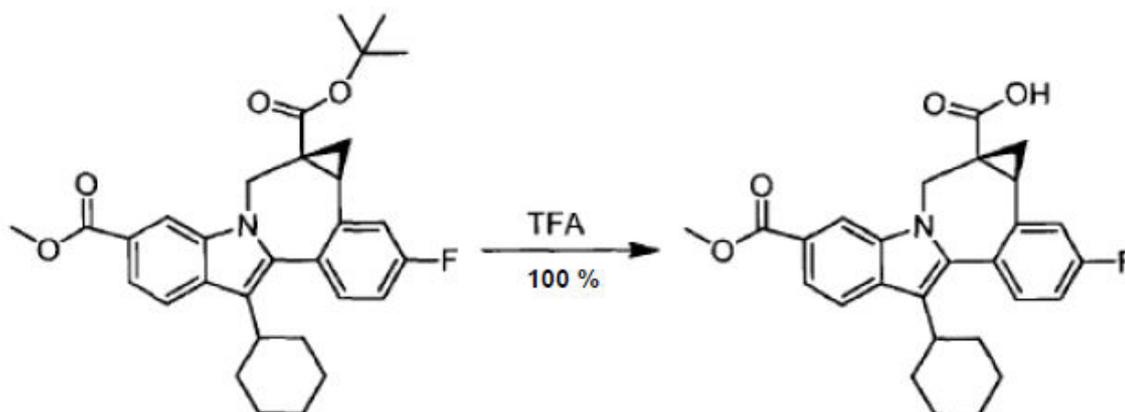
25

Se separó el compuesto racémico quiralmente, produciendo 1,35 g como un sólido blanco. Para la separación quiral, se usaron las siguientes condiciones, y el compuesto más rápido en eluir fue el enantiómero deseado. Columna: ChiralPak AD-H, 30 x 250 mm, 5 mm; Fase móvil: MeOH al 20 %/ CO_2 al 80 %; Presión: 15.000 kPa; Temperatura: 35 $^\circ\text{C}$; caudal: 70 ml/min; UV: 210 nm. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (rotámeros) δ 8,34-8,29 (m, 0,5H), 8,17 (s, 0,5H), 7,91-7,85 (m, 1H), 7,78 (dd, $J = 18,8$; 1,4 Hz, 1H), 7,38-7,21 (m, 2H), 7,14-7,05 (m, 1H), 5,50-5,41 (m, 0,5H), 5,22-5,15 (m, 0,5H), 4,06 (d, $J = 15,3$ Hz, 0,5 H), 3,99 (s, 1,5H), 3,97 (s, 1,5H), 3,48-3,39 (m, 0,5H), 2,96-2,86 (m, 1H), 2,81-2,72 (m, 0,5H), 2,63-2,53 (m, 0,5H), 2,18-1,24 (m, 11H), 1,55 (s, 4,5H), 1,32 (s, 4,5H), 1,16 (dd, $J = 6,1$; 4,3 Hz, 0,5H), 0,38 (t, $J = 6,1$ Hz, 0,5H).

35

Preparación 7

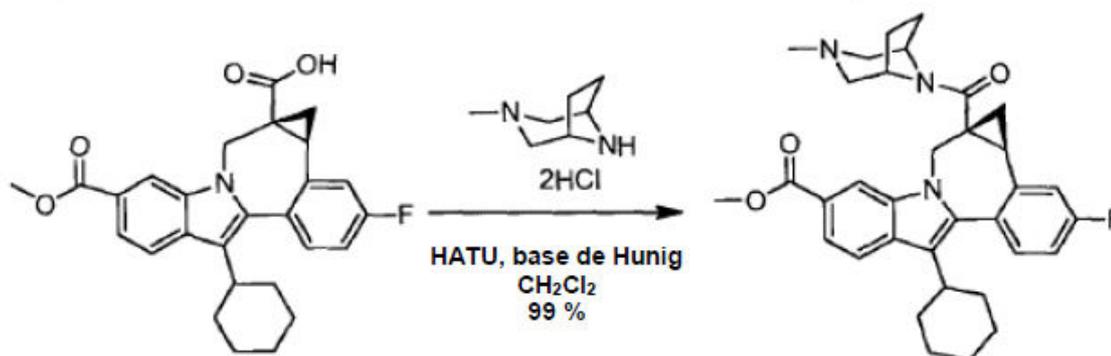
Ácido (1*a*S,12*b*R)-8-ciclohexil-11-fluoro-5-(metoxicarbonil)-1,12*b*-dihidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-1*a*(2*H*)-carboxílico



5 Se agitó una mezcla de material de partida (700 mg, 1,39 mmol) y TFA (5 ml, 64,9 mmol) a temperatura ambiente durante 3 h. La LCMS indicó el consumo completo del diéster. Se concentró la mezcla de reacción al vacío, proporcionando 630 mg (100 %) del producto en forma de un sólido blanquecino. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (rotámeros) δ 8,41 (d, $J = 1,0$ Hz, 0,6H), 8,16 (s, 0,4H), 7,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 0,4H), 7,85 (d, $J = 8,5$ Hz, 0,6 H), 7,75 (dd, $J = 8,4$; 1,4 Hz, 0,4H), 7,67 (dd, $J = 8,4$; 1,4 Hz, 0,6H), 7,49-7,34 (m, 2H), 7,25-7,13 (m, 1H), 5,50 (d, $J = 15,6$ Hz, 0,6H), 5,28 (d, $J = 15,1$ Hz, 0,4H), 4,05 (d, $J = 15,1$ Hz, 0,4H), 3,96 (s, 1,2H), 3,95 (s, 1,8H), 3,52-3,45 (m, 0,6H), 3,00-2,74 (m, 2H), 2,23-1,23 (m, 11,6H), 0,24 (t, $J = 6,0$ Hz, 0,4H); LCMS: Tr = 2,60 (min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 0 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 448,29.

15 Preparación 8

(1*a*R,12*b*S)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxilato metílico

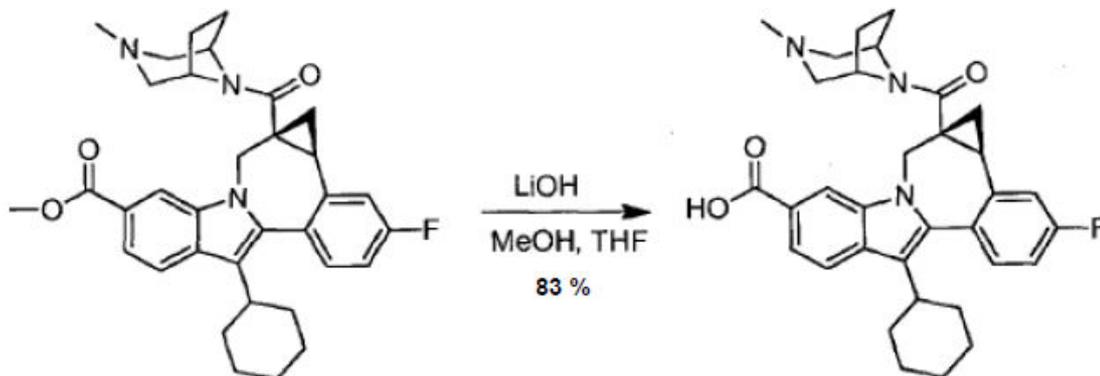


20 Se agitó una mezcla de ácido de partida (300 mg, 0,670 mmol), bisclorhidrato de (1*R*, 5*S*)-3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano (160 mg, 0,804 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (HATU) (258 mg, 0,804 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (base de Hunig) (0,467 ml, 2,68 mmol) en DCM (4 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se concentró la mezcla de reacción al vacío. Se diluyó el residuo con EtOAc, se lavó con agua (5 veces), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío, proporcionando 370 mg (99 %) del producto en forma de un sólido amarillo claro. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (rotámeros) δ 8,17 (s, 0,35H), 8,03 (s, 0,65H), 7,93 (d, $J = 8,5$ Hz, 0,35H), 7,89 (d, $J = 8,4$ Hz, 0,65H), 7,69 (dd, $J = 8,5$; 1,3 Hz, 0,35H), 7,62 (dd, $J = 8,5$; 1,3 Hz, 0,65H), 7,51-7,25 (m, 3H), 5,12 (d, $J = 15,6$ Hz, 0,65H), 4,94 (d, $J = 15,1$ Hz, 0,35H), 4,32 (s, 1H), 4,11 (d, $J = 15,3$ Hz, 0,35H), 4,03-3,96 (m, 0,65H), 3,90 (s, 1H), 3,88 (s, 2H), 3,64 (s ancho, 0,35H), 3,61 (d, $J = 15,4$ Hz, 0,65H), 2,94-2,84 (m, 1H), 2,79-1,05 (m, 24H). LCMS: (Tr = 2,26 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 0 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 556,50.

35

Preparación 9

Ácido (1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclo-propa[d]indolo[2,1-a][2]benzazepin-5-carboxílico



5

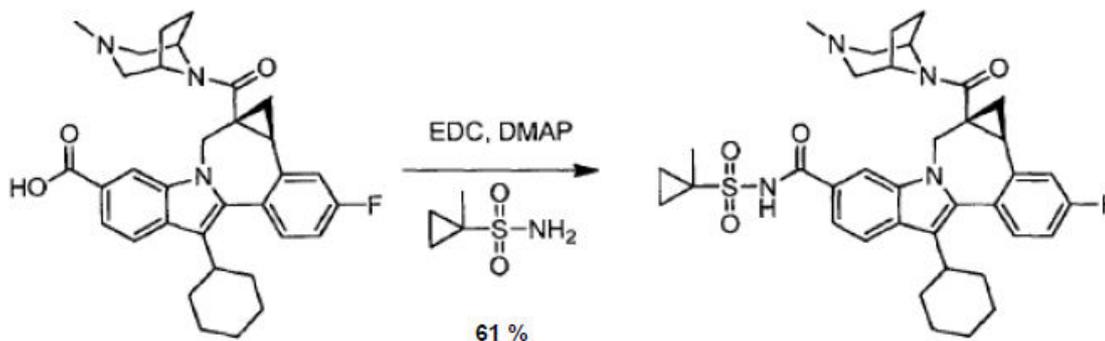
Se calentó una mezcla del éster (400 mg, 0,720 mmol), NaOH 1 N (3,60 ml, 3,60 mmol) y MeOH (4 ml) a reflujo durante 3 h. Luego se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua y se acidificó con HCl 1N hasta alcanzar pH = 4. Se recogió el precipitado blanco que se formó por filtración y se lavó con agua. Se secó el sólido blanco, produciendo 360 mg (83 %) del producto en forma de un sólido blanquecino. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (rotámetros) δ 8,16 (s, 0,35H), 8,02 (s, 0,65H), 7,90 (d, $J = 8,4$ Hz, 0,35H), 7,86 (d, $J = 8,4$ Hz, 0,65H), 7,69 (d, $J = 8,4$ Hz, 0,35H), 7,63 (d, $J = 8,4$ Hz, 0,65H), 7,51-7,38 (m, 2H), 7,34- 7,24 (m, 1H), 5,15 (d, $J = 15,3$ Hz, 0,65H), 4,99 (d, $J = 16,2$ Hz, 0,35H), 4,56-4,40 (m, 1H), 4,18-4,6 (m, 1H), 3,65-3,57 (m, 1H), 2,94-2,84 (m, 1H), 2,79-1,15 (m, 24H). LCMS: (Tr = 2,19 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 0 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 542,52.

10

15

Preparación 10

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[d]indolo[2,1-a][2]benzazepin-5-carboxamida



25

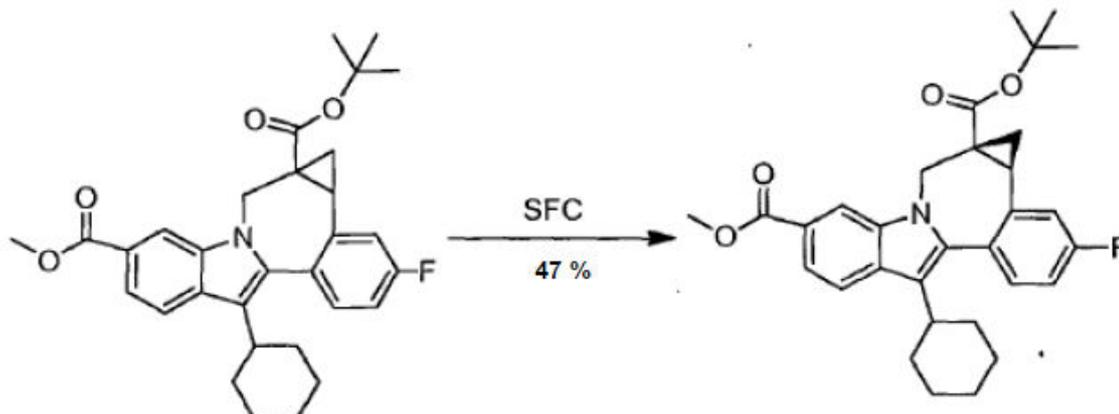
Se agitó una mezcla del ácido de partida (40 mg, 0,074 mmol), 1-metilciclopropano-1-sulfonamida (20,0 mg, 0,15 mmol), EDC (28 mg, 0,15 mmol), DMAP (27 mg, 0,22 mmol) en DCM (2 ml) a temperatura ambiente durante 16 h. A continuación, se concentró y se purificó por HPLC preparativa (columna: Waters Sunfire C18 OBD 30 x 100 mm, Gradiente: B del 50 al 75 %; disolvente A: agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %; disolvente B: agua al 10 %:metanol al 90 %: TFA al 0,1 %; tiempo del gradiente = 18 min; tiempo de detención = 20 min; caudal = 25 ml/min, detección UV, longitud de onda: 220 nm), dando 31 mg (61 %) del producto en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (rotámetro principal) δ 8,01 (s ancho, 1H), 7,88 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,58 (d ancho, 1H), 7,36 (m, 1H) 7,29 (d, $J = 2,5$ Hz 1H), 7,20 (dd, $J = 9,5, 2,5$ Hz, 1H), 7,10-7,06 (m, 1H), 5,20 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H), 4,42 (s ancho, 1H), 4,15 (d, $J = 14,5$ Hz, 1H), 3,58 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), 3,39 (s ancho, 1H), 2,91 (t, $J = 12,0$ Hz, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,56 (s, 1H), 2,22 (m, 1H), 1,99 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,50 (m, 5H), 1,25 (m 2H), 1,20 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), 0,95 (m, 4H). LCMS: (Tr = 2,16 min), Columna: PHENOMENEX-LUNA 2,0 x 30 mm (3 μm), fase móvil: gradiente de B del 0 al 100 %, disolvente A (agua al 90 %:metanol al 10 %:TFA al 0,1 %); disolvente B (agua al 10 %:metanol al 90 %:TFA al 0,1 %), caudal: 1,0 ml/min; (M + H) = 659,27.

30

35

Preparación 11

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1,12b-dihidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-1*a*,5(2*H*)-dicarboxilato de 5-metil-1*a*-(2-metil-2-propanilo)



5

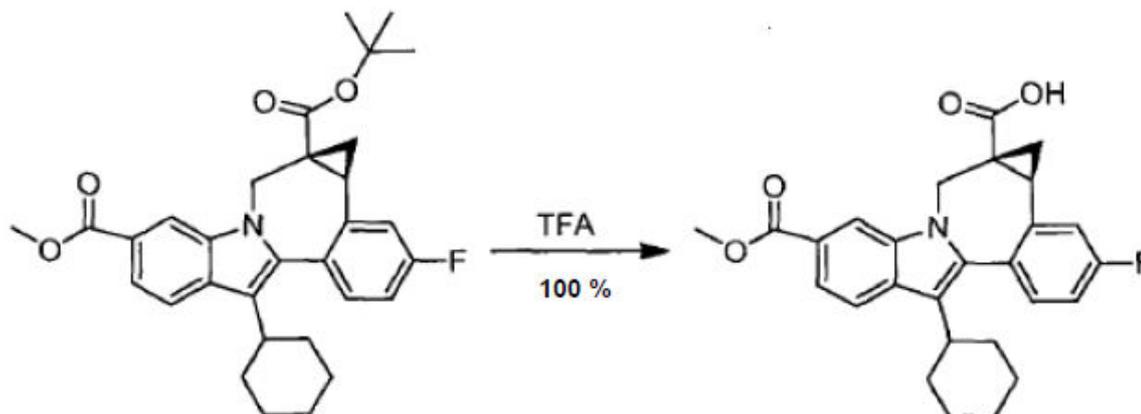
A continuación, se describen las condiciones usadas para la separación por SFC de los enantiómeros a escala preparativa. Se dividió un solo lote de 580 g de producto racémico y se separó en dos series como se describe a continuación. Se separaron 275,6 gramos usando las siguientes condiciones de SFC preparativa. La pureza de la fracción de isómero diana fue determinada por las condiciones de SFC analítica. El rendimiento del isómero diana resultó ser de aproximadamente 120 gramos. Se separaron 211,8 gramos usando las siguientes condiciones de SFC preparativa. La pureza de la fracción de isómero diana fue determinada por las condiciones de SFC analítica. El rendimiento del isómero diana resultó ser de aproximadamente 102 gramos. La pureza quiral del isómero diana de ambas series resultó ser > 99,9 %.

10

15

Preparación 12

Ácido (1*aS*,12*bR*)-8-ciclohexil-11-fluoro-5-(metoxicarbonil)-1,12b-dihidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-1*a*(2*H*)-carboxílico



20

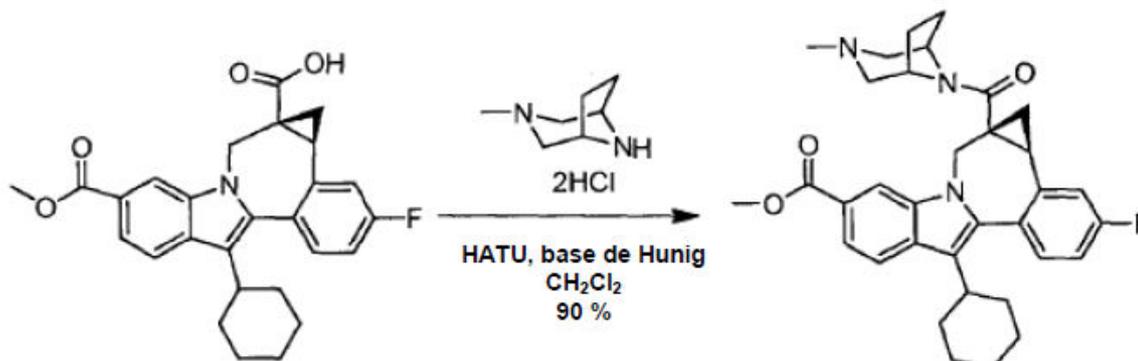
A una solución del material de partida (87 g, 173 mmol) en CH₂Cl₂ (870 ml) enfrida con un baño de hielo, se añadió ácido trifluoroacético (394 g, 3455 mmol). Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 22 h. Se retiraron el disolvente y el TFA, y se disolvió el residuo en CH₂Cl₂ (1.000 ml). Se lavó la solución con agua (4 x 500 ml), salmuera (500 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío y alto vacío, dando el producto en bruto de ácido (4*bS*,5*aR*)-12-ciclohexil-3-fluoro-9-(metoxicarbonil)-4*b*,5,5*a*,6-tetrahidrobenzo[3,4]ciclopropa-[5,6]azepino[1,2-*a*]indol-5*a*-carboxílico (79 g, 177 mmol, rendimiento del 102 %) en forma de un aceite amarillo que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 0,5H), 8,17 (s ancho, 1,5H), 7,86-7,90 (m, 1H), 7,73-7,81 (m, 1H), 7,23-7,38 (m, 2H), 7,10-7,16 (m, 1H), 5,48 (d, *J* = 16,0 Hz, 0,5 H), 5,24 (d, *J* = 16,0 Hz, 0,5H), 4,8-4,20 (m, 1H), 4,0 (s, 3H), 3,98 (d, *J* = 16,0 Hz, 0,5H), 3,46 (d, *J* = 16,0 Hz, 0,5H), 2,90-3,03 (m, 1H), 2,75-2,80 (m, 1H), 1,21-2,18 (m, 10H), 0,89-0,93 (m, 0,5H), 0,50-0,53 (m, 0,5H).

25

30

Preparación 13

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxilato metílico



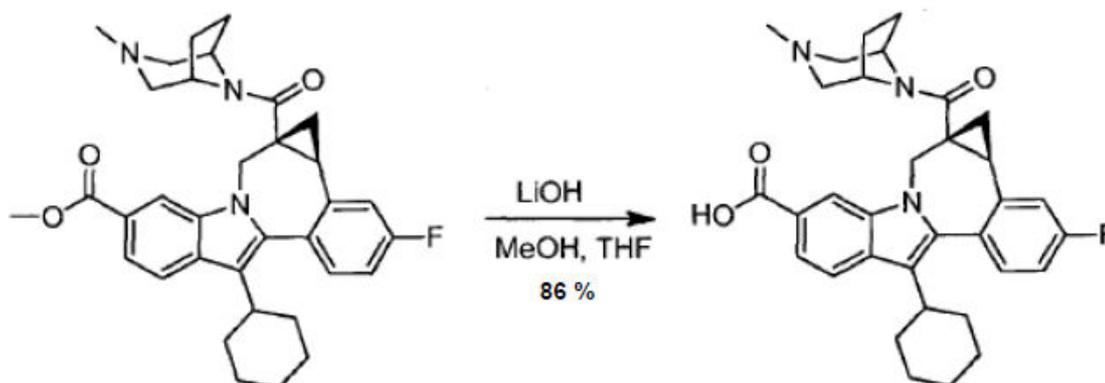
5

A un matraz de fondo redondo de 3 l, de tres bocas, lavado abundantemente con N₂, se añadió ácido de partida (79 g, 177 mmol), CH₂Cl₂ (1,000 ml), sal bis-HCl de (1*R*,5*S*)-3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano (42,23 g, 212 mmol), hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (81 g, 212 mmol) y *N,N*-di-isopropiletilamina (123 ml, 706 mmol), respectivamente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h. Se diluyó con agua (1000 ml). Tras agitar durante 10 minutos, se separó la fase orgánica y se extrajo la capa acuosa con CH₂Cl₂ (500 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua (2 x 1.000 ml), salmuera (1.000 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta ~200 ml. A continuación, se sometió la solución a una columna de gel de sílice ultrarrápida (empaquetada con hexano) usando TEA al 3 %/EtOAc del 30 % al 70 % en hexano, dando el producto (88 g, 158 mmol, rendimiento del 90 %) como una espuma amarilla. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (s ancho, 0,5H), 8,08 (s ancho, 0,5H), 7,87-7,92 (m, 1H), 7,76-7,83 (m, 1H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,8-7,15 (m, 1H), 5,21 (d, *J* = 15,0 Hz, 0,5H), 4,24 (d, *J* = 15,0 Hz, 0,5H), 4,12-4,17 (m, 1,5H), 3,93-3,98 (m, 3,5H), 3,61 (d, *J* = 15,0 Hz, 0,5H), 3,38 (s ancho, 0,5H), 2,94 (t, *J* = 15,0 Hz, 1H), 2,72-2,81 (m, 2H), 1,06-2,52 (m, 22H).

20

Preparación 14

Ácido (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxílico



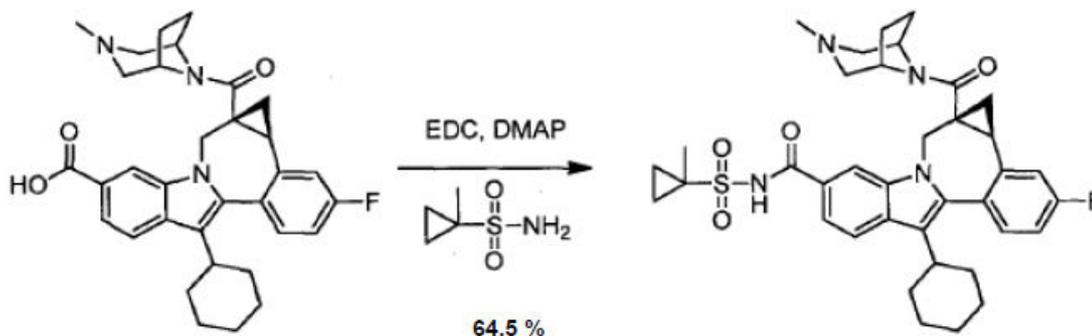
25

A una solución del éster de partida (50 g, 90 mmol) en THF (400 ml) y MeOH (100 ml), se añadió una solución de hidróxido de litio (10,77 g, 450 mmol) en agua (100 ml). Se calentó la mezcla hasta 50 °C durante 16 h. La HPLC indicó la finalización de la reacción. Tras enfriar, se eliminaron los disolventes orgánicos, y se extrajo la suspensión amarilla residual con EtOAc (2 x 400 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera (500 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío, dando un sólido en bruto que se trituró con CH₂Cl₂ (80 ml, temperatura ambiente a -20 °C), proporcionando el producto (41,76 g, 77 mmol, 86 % de rendimiento) en forma de un sólido blanco. 99,8 % de pureza de la superficie de HPLC. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,00 (s ancho, 1H), 7,79 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,58-7,66 (m, 1H), 7,26-7,32 (m, 2H), 7,7-7,17 (m, 1H), 4,79-5,07 (m, 1H), 4,4-4,26 (m, 2H), 3,88 (s ancho, 1H), 3,57 (d, *J* = 15 Hz, 1H), 3,21 (s, 3H), 1,03-2,89 (m, 21H).

35

Preparación 15

(1*aR*,12*bS*)-8-Ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1a-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1a,2,12b-tetrahidrociclopropano[*d*]indolo[2,1-*a*]benzazepin-5-carboxamida



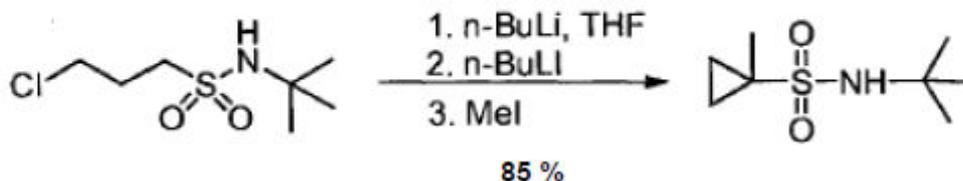
5

Se agitó una mezcla de material de partida (27,3 g, 50,4 mmol), 1-metilciclopropano-1-sulfonamida (20,44 g, 151 mmol), 4-dimetilaminopiridina (24,63 g, 202 mmol) y EDC (29,0 g, 151 mmol) en CH₂Cl₂ (250 ml) a temperatura ambiente durante 72 h. Se acidificó la mezcla con HCl 1 N (~200 ml) a pH = 4. Tras agitar durante 30 minutos, se separó la fase orgánica y se extrajo la capa acuosa con CH₂Cl₂ (200 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua (3 x 250 ml, se añadió una pequeña cantidad de NaCl para ayudar a la separación), salmuera (250 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío, dando una mezcla en bruto que se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml). Se sometió la solución a una columna de gel de sílice usando MeOH al 3 % e en CH₂Cl₂ como eluyente, proporcionando el producto como un sólido blanco (21,5 g, 32,5 mmol, rendimiento del 64,5 %). 99,8 % de pureza de la superficie de HPLC. El sólido anterior contenía CH₂Cl₂ al ~3 %. Se disolvió en MeOH (50 ml) y se evaporó el disolvente al vacío. Se volvió a disolver el material seco en MeOH (50 ml) y se eliminó el disolvente al vacío, dando un residuo que se secó en un horno de alto vacío a 60 °C durante 24 h, proporcionando el producto (21 g) en forma de un sólido blanquecino. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s ancho, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,58 (s ancho, 1H), 7,36 (m, 1H), 7,29 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 9,5 y 2,5 Hz, 1H), 7,06-7,10 (m, 1H), 5,20 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 4,42 (s ancho, 1H), 4,15 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 3,58 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 3,39 (s ancho, 1H), 2,91 (t, *J* = 12,0 Hz, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,56 (s ancho, 1H), 2,22 (m, 1H), 1,99 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,50 (m, 5H), 1,25 (m, 2H), 1,20 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 0,95 (m, 4H).

25

Preparación 16

N-(*tert*-Butil)-1-metilciclopropano-1-sulfonamida



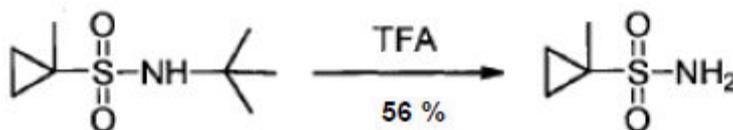
A un matraz de fondo redondo de 5 l y cuatro bocas, se añadió *N*-(*tert*-butil)-3-cloropropano-1-sulfonamida (previamente secada por destilación azeotrópica con 3 x 100 ml de tolueno) (100 g, 468 mmol) y THF (1.500 ml). Se enfrió esto hasta una temperatura interna de -69 °C, y a continuación, se añadió butil-litio (2,5 M en hexanos, 412 ml, 1,02 mol) gota a gota durante un período de 55 min, manteniendo la temperatura interna por debajo de -65 °C. Se retiró el baño de hielo, y se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente durante 1,5 h, para después volver a enfriar hasta una temperatura interna de -69 °C. Se añadió butil-litio (196 ml, 515 mmol) a la mezcla de reacción durante un período de 25 min manteniendo la temperatura interna por debajo de -65 °C. Después, se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente en el transcurso de 1,5 h. Se volvió a enfriar la mezcla de reacción hasta una temperatura interna de -69 °C, y se añadió yodometano (58,5 ml, 936 mmol) gota a gota durante un período de 40 min, manteniendo la temperatura interna por debajo de -65 °C. Se calentó la mezcla de reacción hasta una temperatura interna de -50 °C en el transcurso de 4 h. Se retiró el baño frío, y se añadió una solución saturada de NH₄Cl (1.000 ml). Se transfirió la mezcla de reacción inactivada a un embudo de decantación junto con acetato de etilo (100 ml) y agua (500 ml). Se separaron las capas, y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (3 x 75 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (700 ml), se secaron con MgSO₄ y se concentraron al vacío, obteniéndose un sólido blanquecino que se secó a alto vacío durante 30 min, proporcionando *N*-(*tert*-butil)-1-metilciclopropano-1-sulfonamida en forma de un sólido blanco (88,5 g, rendimiento

del 99 %). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4,07 (s ancho, 1H), 1,51 (s, 3H), 1,38-1,41 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 0,77-0,80 (m, 2H).

Preparación 17

5

1-Metilciclopropano-1-sulfonamida



10 A un matraz de fondo redondo de 1 l y una boca, se añadió *N*-(*terc*-butil)-1-metilciclopropano-1-sulfonamida (78,6 g, 411 mmol) y TFA (340 ml). Se agitó la solución marrón durante la noche a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción (a 50 °C), obteniéndose un aceite marrón. Se sopló una corriente de N_2 en el aceite durante aproximadamente 35 minutos, tras lo que se formó un semisólido marrón. Se suspendió el semisólido en acetato de etilo (80 ml) y hexano (231 ml). Se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se filtró al vacío. Se enjuagó la torta del filtro con hexano y después se secó durante la noche, dando un sólido en bruto de color castaño (51,6 g). Se recristalizó el sólido en una mezcla de acetato de etilo (190 ml) y hexano (270 ml), (calor a reflujo, enfriada hasta la temperatura ambiente y filtrada al vacío a temperatura ambiente), dando un sólido blanquecino (37,6 g, rendimiento del 68 %). Se disolvió el sólido blanquecino (37,6 g) en acetato de etilo caliente (257 ml), se diluyó con hexano (177 ml) y después se calentó a reflujo durante 5 minutos. Se enfrió la solución caliente hasta la temperatura ambiente, se filtró al vacío la suspensión blanca resultante, y se secó la torta del filtro, obteniéndose un sólido blanco (56,6 g, 416 mmol, rendimiento del 56 %). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) δ 6,72 (s ancho, 2H), 1,44 (s, 3H), 1,13 (dd, $J = 6,1$ y 4,0 Hz, 2H), 0,74 (dd, $J = 6,1$ y 4,0 Hz, 2H). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) δ 36,4; 17,6; 12,1.

15

20

El Compuesto I se evaluó para determinar la actividad antiviral según lo determinado por los siguientes ensayos:

25

Métodos biológicos

Clonación, expresión y purificación de la proteína NS5B RdRp del VHC. Se clonó el ADNc que codifica la proteína NS5B del VHC, genotipo 1b, en el vector de expresión pET21a. La proteína se expresó con un truncamiento C-terminal de 18 aminoácidos para potenciar su solubilidad. Se usó la línea celular competente BL21 (DE3) de *E. coli* para la expresión de la proteína. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C durante ~4 horas hasta que alcanzaron una densidad óptica de 2,0 a 600 nm. Los cultivos se enfriaron hasta 20 °C y se indujeron con IPTG 1 mM. Se añadió ampicilina recién preparada a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ y las células se cultivaron una noche a 20 °C.

30

Se lisaron por purificación los sedimentos celulares (3 l), proporcionando 15-24 mg de NS5B purificada. El tampón de lisis consistía en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, triton X-100 al 0,5 %, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 20 %, 0,5 mg/ml de lisozima, MgCl_2 10 mM, 15 $\mu\text{g/ml}$ de desoxirribonucleasa I, y comprimidos de inhibidor de proteasa Complete™ (Roche). Tras la adición del tampón de lisis, se volvieron a suspender los sedimentos celulares congelados usando un homogeneizador de tejidos. Para reducir la viscosidad de la muestra, se sonicaron alícuotas del lisado sobre hielo usando una micropunta conectada a un sonicador Branson. Se centrifugó el lisado sonificado a 100.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y se filtró a través de una unidad de filtrado a 0,2 μm (Corning).

35

40

Se purificó la proteína usando dos etapas de cromatografía secuenciales: Heparin sepharose CL-6B y poliU sepharose 4B (Pharmacia). Los tampones de cromatografía eran idénticos al tampón de lisis, pero no contenían lisozima, desoxirribonucleasa I, MgCl_2 ni inhibidor de proteasa, y la concentración de NaCl en el tampón se ajustó de acuerdo con los requisitos de carga de la proteína en la columna. Cada columna se eluyó con un gradiente de NaCl que variaba en longitud de 5 a 50 volúmenes de columna dependiendo del tipo de columna. Tras la etapa cromatográfica final, la pureza resultante de la enzima resultó ser >90 % basándose en el análisis SDS-PAGE. Se recogieron alícuotas de la enzima y se almacenaron a -80 °C.

45

50

Ensayo enzimático de rNS5B RdRp del VHC. Se usó un ensayo homogéneo en fase sólida sobre perlas en un formato de 384 pocillos para evaluar los inhibidores de NS5B (Wang Y-K, Rigat K, Roberts S y Gao M (2006) *Anal Biochem*, 359: 106-111). Se capturó el cebador oligo dT12 biotinilado sobre perlas de formación de imágenes acopladas a estreptavidina (GE, RPNQ0261), mezclando el cebador y las perlas en 1 x tampón, e incubando a temperatura ambiente durante tres horas. Tras centrifugar, se retiró el cebador sin unir. Se volvieron a suspender las perlas unidas al cebador en 3 x mezcla de reacción (tampón de HEPES 20 mM, pH 7,5, perlas acopladas a cebador dT, molde poli A, 3H-UTP e inhibidor de ARNasa (Promega N2515)). Se diluyeron los compuestos en serie 1:3 en DMSO y se repartieron en alícuotas en las placas de ensayo. Se añadieron volúmenes iguales (10 ml) de agua, 3 x mezcla de reacción y enzima en 3 x tampón de ensayo (tampón de HEPES 60 mM, pH 7,5, MgCl_2 7,5 mM, KCl 7,5 mM, DTT 3 mM, 0,03 mg/ml de BSA, glicerol al 6 %) al compuesto diluido en la placa de ensayo. Concentración final

55

60

de los componentes del ensayo de 384 pocillos: molde 0,36 nM, cebador 15 nM, 3H-UTP 0,29 mM (0,3 µCi), 1,6 U/µ de inhibidor de ARNasa, enzima NS5B 7 nM, 0,01 mg/ml de BSA, DTT 1 mM y 0,33 mg/ml de perlas, tampón de HEPES 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 2,5 mM y DMSO al 0,1 %.

5 Se dejó que las reacciones se produjeran durante 4 horas a 30 °C, y se finalizaron mediante la adición de EDTA 50 mM (10 µl). Tras incubar durante al menos 15 minutos, se leyeron las placas en un sistema de generación de imágenes multimodalidad Amersham LEADseeker.

10 Se determinaron los valores de CI₅₀ para los compuestos usando las diez [I] diferentes. Los valores de CI₅₀ se calcularon a partir de la inhibición usando la forma logística de cuatro parámetros $y = A + ((B-A)/(1 + ((C/x)^D)))$, donde A y B denotan el % de inhibición mínima y máxima, respectivamente, C es la CI₅₀, D es la pendiente y x representa la concentración del compuesto.

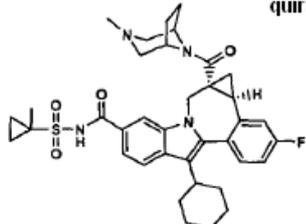
15 *Líneas celulares.* Las líneas celulares usadas para evaluar los compuestos consisten en una línea celular humana derivada de hepatocitos (Huh-7) que expresa constitutivamente un replicón de VHC de genotipo 1b que contiene un gen informador de luciferasa de *Renilla*. Dichas células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 1,0 mg/ml de G418.

20 *Ensayo con luciferasa del replicón del VHC.* Para evaluar la eficacia del compuesto, se transfirieron compuestos valorados a placas estériles tratadas con cultivo tisular de 384 pocillos, y se sembraron las placas con células de replicón de VHC (50 µl a una densidad de $2,4 \times 10^3$ células/pocillo) en DMEM que contenía FBS al 4 % (concentración final de DMSO al 0,5 %). Tras 3 días de incubación a 37 °C, se analizaron las células para determinar la actividad de la luciferasa de *Renilla* usando el sustrato EnduRen (Promega cat N° E6485) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se diluyó el sustrato EnduRen en DMEM y después se añadió a las placas hasta una concentración final de 7,5 µM. Se incubaron las placas durante al menos 1 h a 37 °C, y luego se leyeron en un Viewlux Imager (PerkinElmer) usando un programa de luminiscencia. Se calculó el 50 % de concentración eficaz (CE₅₀) usando la fórmula logística de cuatro parámetros indicada anteriormente.

30 Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos, se añadió Cell Titer-Blue (Promega) a las placas que contenían EnduRen y se incubaron durante al menos 4 horas a 37 °C. Se leyó la señal de fluorescencia de cada pocillo usando un Viewlux Imager. Todos los valores de CE₅₀ se calcularon usando la fórmula logística de cuatro parámetros

En la Tabla 2, se presentan los datos de la enzima y del replicón para el Compuesto I.

35

Estructura	CE ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)
 <p style="text-align: center;">quiral</p>	0,007	0,005

Se evaluó el Compuesto I para determinar la actividad del canal iónico según lo determinado por los siguientes ensayos.

40 El canal iónico responsable del componente rápido de la corriente de potasio rectificadora retardada cardíaca (IKr) está codificado por el gen del canal de potasio, hERG (gen relacionado con éter-a-go-go humano). Las mutaciones en hERG causan la forma ligada al cromosoma 7 del síndrome de QT largo congénito (LQT2). La prolongación del intervalo QT y el aumento de la duración del potencial de acción (DPA) pueden conducir a la arritmia ventricular potencialmente mortal, torsade de pointes.

45

Método de evaluación de los canales de potasio hERG con flujo. El ensayo de flujo de hERG es un ensayo funcional de rendimiento relativamente alto para predecir la inhibición de hERG que se basa en FLIPR, y se ha validado frente a inhibidores de IKr conocidos y en comparación con los datos de modelos de pinzamiento zonal, de unión e *in silico*.

50

El ensayo de flujo de hERG fue validado con fármacos clínicos que inhiben el canal del potasio hERG y también prolongan el intervalo QT cardíaco. Para el 85 % de los compuestos ensayados hasta la fecha, los datos de CI₅₀ del flujo de hERG están desplazados a la derecha con respecto a las determinaciones de CI₅₀ mediante pinzamiento zonal en una diferencia mediana de aproximadamente siete, y el 15 % restante muestra un desplazamiento superior a 10 veces. Por consiguiente, los datos de flujo de hERG se deben interpretar de la siguiente manera: una CI₅₀ de

55

<5 μM se considera potente con una alta probabilidad de tener una Cl_{50} submicromolar en el ensayo de pinzamiento zonal de hERG; 5-80 μM se debe considerar moderadamente potente; y > 80 μM se debe considerar débil.

Preparación de las células. Se cultivaron células HEK293 que expresaban de manera estable los canales de hERG en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10 % de Sigma, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM y 500 $\mu\text{g/ml}$ de G418, a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 5 %. Se sembraron las células en placas negras/transparentes recubiertas de poli-D-lisina de 384 pocillos de Corning en una densidad de 2×10^4 células por pocillo (20 μl) en medio con suero al 10 %, y se incubaron durante 15-24 horas a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 5 % hasta que se obtuvo una monocapa confluyente de células.

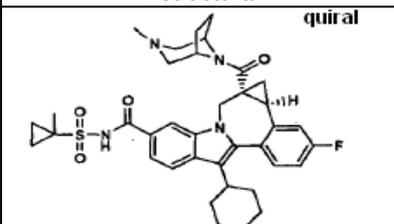
Carga de colorante BTC. Se preparó una solución madre 2 mM de colorante BTC-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) en DMSO al 100 % y después se añadió 1:1 a ácido plurónico al 10 % (p/v) en DMSO el día del ensayo. A continuación se diluyó el colorante en tampón EP externo de hERG. Se añadió dicha mezcla de colorante BTC (30 μl) a las células, produciéndose una concentración de carga final de 2,5 μM . Se incubaron las células a 21 °C durante 45 minutos. El tampón EP externo de hERG contenía NaCl 140 mM, KCl 4,0 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1,0 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3 y glucosa 10 mM; era el mismo tampón usado para los experimentos de pinzamiento zonal (siendo todos los componentes del tampón obtenidos en Sigma Chemical).

Preparación de muestras. Se diluyeron muestras de ensayo hasta DMSO 10 mM, y se diluyeron en serie a una proporción de 1:2 en DMSO en una placa de 384 pocillos. Se transfirieron 2,5 μl de muestra de ensayo diluida en serie a 75 μl de tampón de electrofisiología externa (EP) de hERG. Tras cargar el colorante e intercambiar el tampón, se añadieron 10 μl de compuestos diluidos en agua a las células de las dos placas por duplicado. Se incubaron previamente los compuestos con las células durante 30-45 minutos antes de la lectura del ensayo en el FLIPR. La preparación de muestras y las diluciones de ensayo produjeron un intervalo de concentraciones final de diez puntos de 80 μM a 0,156 nM.

Ensayo FLIPR. Las células cargadas con colorante se leen en el FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita el colorante usando la línea de 488 nm de un láser de argón. Se filtró la emisión usando un filtro de paso de banda 540 ± 30 nm. Se estimularon los canales de hERG para que se abrieran mediante la adición de 10 μl /pocillo de tampón EP que contenía K_2SO_4 33 mM y Ti_2SO_4 0,66 mM (Sigma/Aldrich). Para cada placa, los datos se recogieron cada segundo durante un período de 10 segundos, momento en el que se añadió el tampón de estímulo que contenía talio. La recogida de los datos se produjo cada segundo durante 50 segundos y, a continuación, prosiguió cada tres segundos durante 2 minutos. La adición de tampón de estímulo produjo un volumen final de 50 μl en la lectura del ensayo, dando un contenido final de DMSO del 0,65 %.

Análisis de los datos. La solidez estadística del ensayo de flujo de hERG se determina a partir de los pocillos en blanco y de los pocillos totales. Los pocillos totales (columnas 21 y 22) definen la activación de hERG máxima para cada placa de compuesto de ensayo (sin compuesto de ensayo presente), y los pocillos en blanco (columnas 23 y 24), que contienen una concentración de saturación de los inhibidores de los canales hERG (dofetilida o E-4031), definen el 100 % de inhibición del canal hERG. Los archivos de datos de las unidades de fluorescencia en bruto generados en el lector de placas FLIPR se exportan automáticamente y se procesan mediante herramientas de análisis de datos internas. Los datos de reducción del porcentaje de inhibición para cada concentración del compuesto de ensayo se ajustaron usando el motor de ajuste MathIQ (ID Business Solutions Limited, Surrey, RU). Los datos se analizaron mediante el ajuste de las amplitudes máximas del cambio en la fluorescencia para el flujo de talio para una condición dada de compuesto de ensayo. Las potencias (valores de Cl_{50}) de los compuestos se calcularon a partir de la media de las dos curvas de concentración-respuesta de 10 puntos.

Tabla 3: Datos de FLIPR

Estructura	Cl_{50} (μM)
 <p style="text-align: center;">quiral</p>	23,4

50 *Método de evaluación de los canales de potasio hERG con pinzamiento zonal*

Línea celular. En el ensayo de hERG, se usaron células humanas de riñón embrionario (HEK293) transfectadas de manera estable con ADNc del gen relacionado con éter-a-go-go humano (hERG). Las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales hERG recombinantes expresados en células HEK293 y de los canales IKr naturales en células cardíacas humanas son casi idénticas. Varios bloqueadores hERG conocidos, incluyendo dofetilida, terfenadina, cisaprida y E-4031 inhiben las corrientes hERG recombinantes en la línea celular estable hERG y las

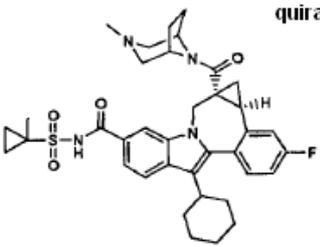
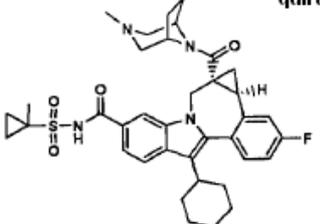
corrientes IKr en miocitos cardíacos aislados con una potencia idéntica.

Pinzamiento zonal. Se realizaron registros de la corriente de membrana con un amplificador de pinzamiento zonal de integración Multiclamp serie 700 (Axon Instruments, Foster City, California) usando la variante de célula completa de la técnica de pinzamiento zonal. Se dispusieron las células que expresaban los canales de potasio hERG en una cámara de baño plexiglás, montada en la pletina de un microscopio invertido, y se infundió de manera continua solución de baño.

La solución de baño de hERG, que reemplazaba al medio de cultivo celular durante los experimentos, contenía (en mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1, glucosa 10, HEPES 10 (pH 7,4, NaOH). Las pipetas de vidrio de borosilicato tenían resistencias de punta de de 2 a 4 MΩ al llenarlas con una solución interna que contiene (en mM): KCl 130, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, ATP-K₂ 5, EGTA 10, HEPES 10 (pH 7,2, KOH).

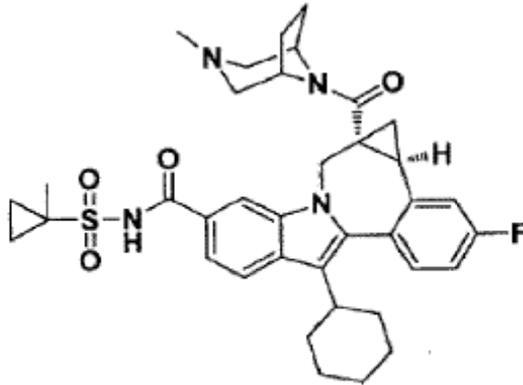
Para empezar, se generó una relación de corriente-tensión en la solución de baño de control usando el siguiente protocolo de tensión. Se generaron corrientes hERG mediante despolarizaciones por etapas de 2 segundos aplicadas desde un potencial de mantenimiento de -80 mV hasta potenciales de ensayo que variaban de -70 mV a +60 mV. Las etapas de tensión se aplicaron en intervalos de 20 segundos. Se generaron corrientes de cola tras la repolarización a -65 mV durante 3 segundos. Mientras se seguía perfundiendo solución de baño de control, se cambió el protocolo de tensión a uno en el que se aplicaron pulsos de ensayo repetitivos (0,05 Hz) a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos. Se generaron corrientes de cola después de los pulsos de ensayo escalonando la tensión hasta -65 mV durante 3 segundos. Tras registrar la corriente en estado estacionario durante 2 a 5 minutos en ausencia de artículo de ensayo (control), se cambió la solución de baño a una que contenía la concentración más baja del artículo de ensayo que se iba a usar. Se monitorizó la corriente de cola máxima hasta que se alcanzó un nuevo estado estacionario en presencia de artículo de ensayo. A esto, le siguió la aplicación de la siguiente concentración más alta de artículo de ensayo que se iba a ensayar, y se repitió hasta que se hubieron evaluado todas las concentraciones de artículo de ensayo. Los efectos del artículo de ensayo en el canal hERG se calcularon midiendo la inhibición de las corrientes de cola máximas. Se representó gráficamente el porcentaje de inhibición de las corrientes de cola en función de la concentración de artículo de ensayo para cuantificar la inhibición del canal hERG. Los efectos del artículo de ensayo se calcularon usando las corrientes de cola, porque no hay corrientes de cola endógenas en las células HEK293 de control transfectadas con el plásmido. Las corrientes de membrana se muestrearon a velocidades de al menos el doble de la velocidad del filtro de paso bajo. El caudal se mantuvo constante a lo largo de los experimentos. Todas las corrientes se registraron a temperatura ambiente ~25 °C.

Tabla 4: Datos de pinzamiento zonal

Estructura	Conc. (μM)	% de inhibición (Media ± DE)	Duplicados
 <p>quiral</p>	10	30,5 ± 1,9	3
 <p>quiral</p>	30	43,4 ± 2,0	3

REIVINDICACIONES

1. El compuesto (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida (Fórmula I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.



I.

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (1*aR*,12*bS*)-8-ciclohexil-11-fluoro-*N*-((1-metilciclopropil)sulfonyl)-1*a*-((3-metil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oct-8-il)carbonil)-1,1*a*,2,12*b*-tetrahidrociclopropa[*d*]indolo[2,1-*a*][2]benzazepin-5-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con un adyuvante, un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
3. Un compuesto de la reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso como un medicamento.
4. Un compuesto de reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de la infección por hepatitis C.