

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 888**

51 Int. Cl.:

**C07D 333/40** (2006.01)

**A61K 31/381** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12738352 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2734515**

54 Título: **Derivados de ácido tiofeno-2-carboxílico útiles como inhibidores de virus Flaviviridae**

30 Prioridad:

**13.07.2011 US 201161507544 P**

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

**01.03.2016**

73 Titular/es:

**GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)  
333 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**WATKINS, WILLIAM J.;  
DOERFFLER, EDWARD MILTON III;  
CANALES, EDA;  
LAZERWITH, SCOTT EDWARD y  
CLARK, MICHAEL O'NEIL HANRAHAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 561 888 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

Derivados de ácido tiofeno-2- carboxílico útiles como inhibidores de virus *Flaviviridae*

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud incluye nuevos inhibidores de virus *Flaviviridae*, composiciones que contienen tales compuestos, y tales compuestos para su uso en métodos terapéuticos que incluyen la administración de tales compuestos.

10 **Antecedentes de la invención**

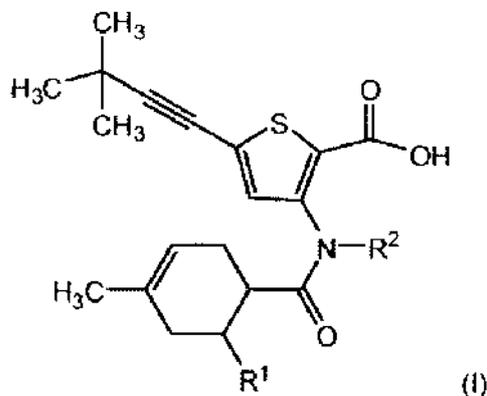
El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de enfermedad hepática crónica a nivel mundial (Boyer, N. *et al.* J Hepatol. 32:98-112, 2000) de modo que una importante atención de la investigación antiviral actual se dirige hacia el desarrollo de métodos mejorados de tratamiento de infecciones crónicas por VHC en seres humanos (Di Besceglie, A.M. y Bacon, B. R., Scientific American, Oct.: 80-85, (1999); Gordon, C. P., *et al.*, J. Med. Chem. 2005, 48, 1-20; Maradpour, D., *et al.*, Nat. Rev. Micro. 2007, 5(6), 453-463). Se han revisado ciertos tratamientos del VHC por Dymock *et al.* en Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 11:2; 79-95 (2000). La cura virológica de los pacientes con infección crónica por VHC es difícil de conseguir debido a la prodigiosa cantidad de producción diaria de virus en los pacientes infectados crónicamente y a la elevada mutabilidad espontánea del virus VHC (Neumann, *et al.*, Science 1998, 282, 103-7; Fukimoto, *et al.*, Hepatology, 1996, 24, 1351-4; Domingo, *et al.*, Gene, 1985, 40, 1-8; Martell, *et al.*, J. Virol. 1992, 66, 3225-9).

Se han usado principalmente dos compuestos, ribavirina, un análogo de nucleósido, e interferón alfa ( $\alpha$ ) (IFN), para tratar las infecciones crónicas por VHC en seres humanos. La ribavirina sola no es eficaz en la reducción de los niveles de ARN viral, tiene una considerable toxicidad, y se conoce que induce anemia. Se ha informado que la combinación de IFN y ribavirina es eficaz en el control de la hepatitis C crónica (Scott, L. J., *et al.* Drugs 2002, 62, 507-556) pero menos de la mitad de los pacientes con este tratamiento muestran un beneficio persistente. Recientemente, también se han aprobado telaprevir y boceprevir en los Estados Unidos para el tratamiento de VHC.

Además, se han desvelado tiofenos sustituidos con alquinilo con actividad anti-virus *Flaviviridae* por Chan, *et al.*, documento de Patente WO 2008058393; Wunberg, *et al.*, documento de Patente WO 2006072347; y Chan, *et al.*, documento de Patente WO 2002100851; pero ninguno de estos está probado actualmente como compuesto terapéutico antiviral. A pesar de los informes descritos anteriormente, las infecciones de la familia de virus *Flaviviridae*, incluyendo VHC, continúan causando una mortalidad, morbilidad y pérdidas económicas considerables a nivel mundial. Por lo tanto, permanece la necesidad de desarrollar tratamientos eficaces para infecciones por virus *Flaviviridae* (por ejemplo, VHC). En particular, existe la necesidad de tratamientos de infecciones por virus *Flaviviridae* que han desarrollado resistencia a una o más de las terapias disponibles actualmente.

40 **Sumario de la invención**

La invención proporciona compuestos que son tratamientos eficaces para infecciones por virus *Flaviviridae*. Además, ciertos compuestos de la invención tienen una actividad útil frente a infecciones por virus *Flaviviridae* resistentes. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable o éster del mismo, en la que:

50 R<sup>1</sup> es H o metilo; y  
R<sup>2</sup> es alquilo C1-C6;  
en el que cada alquilo representa una cadena lineal o ramificada.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula I para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección viral de *Flaviviridae* o una infección por virus de la hepatitis C.

5 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o éster del mismo y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de Fórmula I puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden seleccionar, sin limitación, entre: interferones, ribavirina o sus análogos, inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, inhibidores de la NS5A, inhibidores de alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, antagonistas de mevalonato descarboxilasa, antagonistas del sistema renina-angiotensina, otros  
10 agentes antifibróticos, antagonistas de endotelina, inhibidores nucleósidos o nucleótidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores no nucleósidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores de la NS4B del VHC, inhibidores de la entrada y/o el ensamblaje viral, agonistas de TLR-7, inhibidores de ciclofilina, inhibidores del IRES del VHC, potenciadores farmacocinéticos y otros fármacos para tratar VHC; o mezclas de los mismos.

15 En el presente documento se desvela un método para el tratamiento o la prevención de los síntomas o efectos de una infección por VHC en un animal infectado que comprendía administrar a, es decir tratar, dicho animal con una combinación, composición o formulación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, y un segundo compuesto que tiene propiedades anti-VHC.

20 En el presente documento se desvelan compuestos de Fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables y ésteres de los mismos y la totalidad de los racematos, enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, y formas polimorfas, pseudopolimorfas y amorfas de los mismos.

25 En el presente documento se desvelan procesos y nuevos compuestos intermedios desvelados en el presente documento que son útiles para preparar compuestos de Fórmula I.

En el presente documento se desvelan nuevos métodos para síntesis, análisis, separación, aislamiento, purificación, caracterización, y ensayo de los compuestos de Fórmula I.

30 En el presente documento se desvelan combinaciones de aspectos y realizaciones, así como preferencias, que se describen en el presente documento a través de la presente memoria descriptiva.

### Descripción detallada

35 A continuación se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas acompañantes. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se ha de entender que no se pretende que limiten la invención a estas realizaciones.

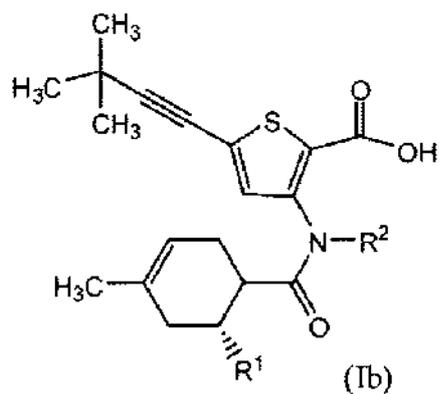
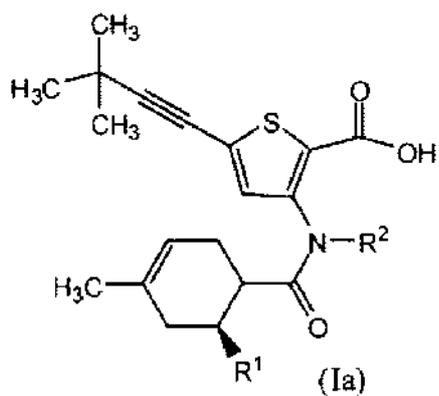
### Definiciones

40 A menos que se indique otra cosa, se pretende que los siguientes términos y expresiones que se usan en el presente documento tengan los siguientes significados. El hecho de que un término o expresión particular no se defina de forma específica no debería tener correlación con inexactitud o falta de claridad, sino que más bien los términos del presente documento se usan dentro de su significado habitual. Cuando se usan nombres comerciales en el presente  
45 documento, los solicitantes pretenden incluir independientemente el producto de nombre comercial y el o los principios farmacéuticamente activos del producto de nombre comercial.

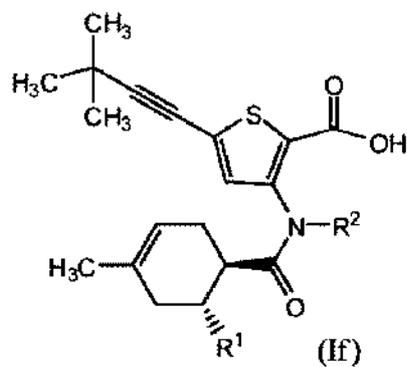
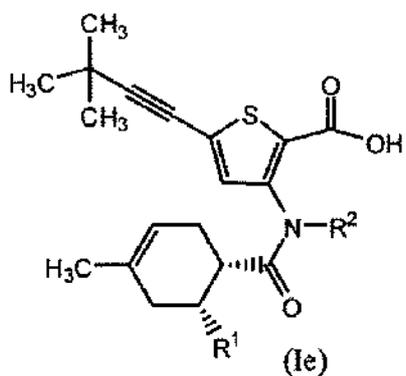
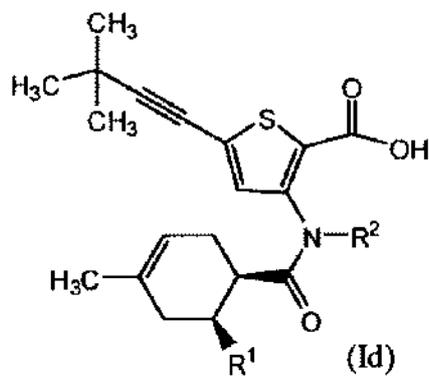
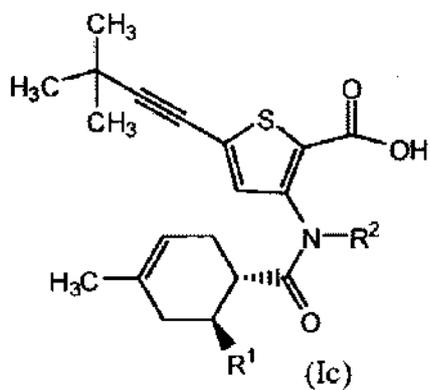
El término "tratar", y los equivalentes gramaticales del mismo, cuando se usan en el contexto de tratar una enfermedad, significan ralentizar o detener la progresión de una enfermedad, o mejorar al menos un síntoma de una  
50 enfermedad, más preferentemente mejorar más de un síntoma de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de una infección por virus de la hepatitis C puede incluir reducir la carga viral del VHC en un ser humano infectado con VHC, y/o reducir la gravedad de la ictericia presente en un ser humano infectado con VHC.

Como se usa en la presente solicitud, el término "alquilo" representa un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadena lineal o de cadena  
55 ramificada.

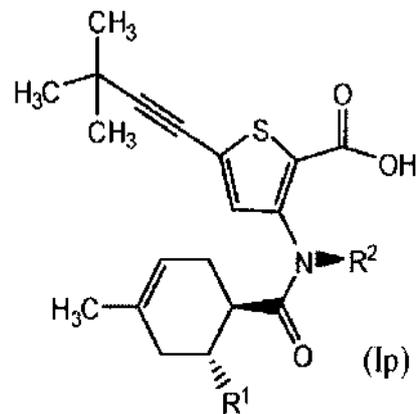
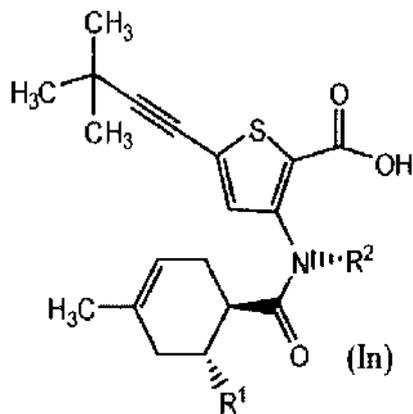
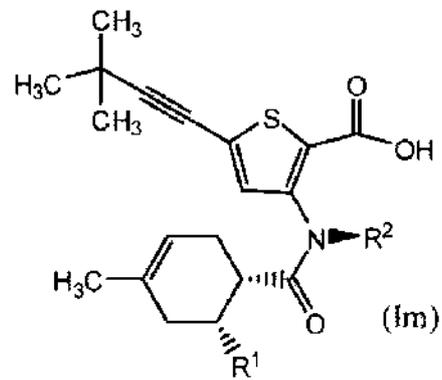
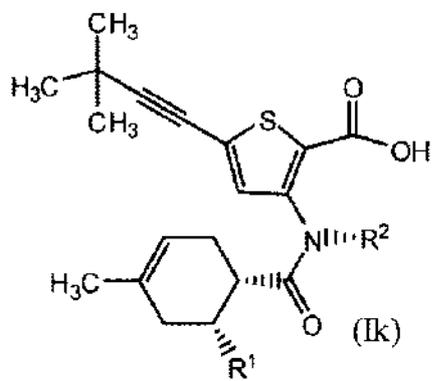
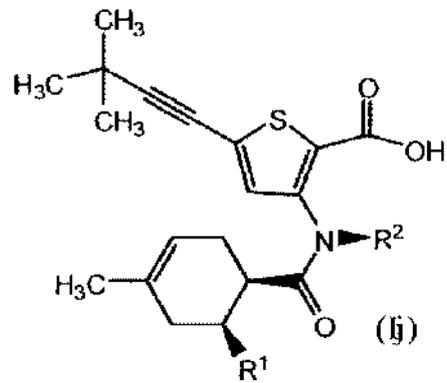
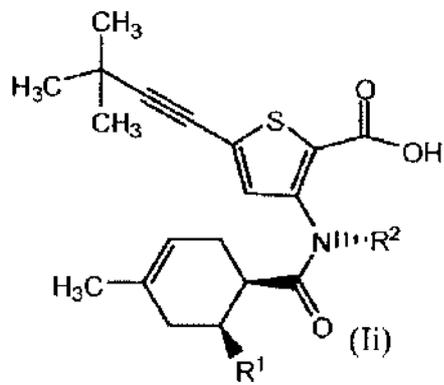
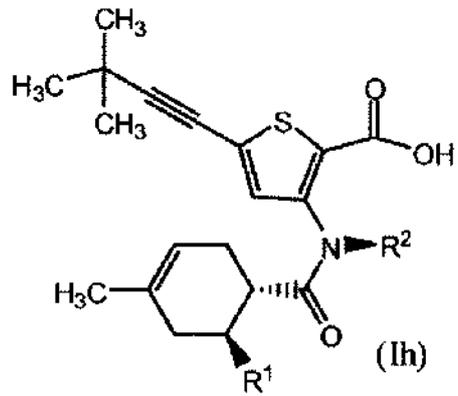
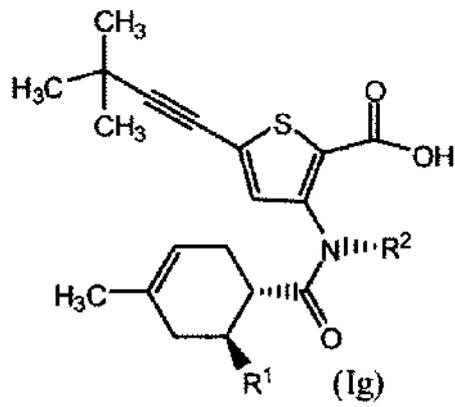
En una realización de la invención el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib)



En una realización de la invención el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ic)-(If):



En una realización de la invención el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ig)-(Ip):



En una realización de la invención R<sup>1</sup> es H.

En una realización de la invención R<sup>1</sup> es metilo.

5 En una realización de la invención R<sup>2</sup> es isopropilo.

Como entenderán los expertos en la materia, los compuestos de la presente invención pueden existir en forma solvatada o hidratada. El alcance de la presente invención incluye tales formas. De nuevo, como entenderán los expertos en la materia, los compuestos pueden ser capaces de esterificación. El alcance de la presente invención incluye ésteres.

"Éster" significa cualquier éster de un compuesto en el que cualquiera de las funciones -COOH de la molécula se reemplaza por una función -C(O)OR, o en el que cualquiera de las funciones -OH de la molécula se reemplaza con una función -OC(O)R, en la que el resto R del éster es cualquier grupo que contiene carbono que forma un resto éster estable, que incluye, pero no se limita a, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heterociclilo, heterocicilalquilo y derivados sustituidos de los mismos.

El experto en la materia reconocerá que se podrían seleccionar sustituyentes y otros restos del compuesto de Fórmula I con el fin de proporcionar un compuesto que sea suficientemente estable para proporcionar un compuesto útil farmacéuticamente que se pueda formular en una composición farmacéutica aceptablemente estable. Se contempla que los compuestos de Fórmula I que tienen tal estabilidad están dentro del alcance de la presente invención.

Un compuesto de Fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden existir en forma de diferentes polimorfos o pseudopolimorfos. Como se usa en el presente documento, polimorfismo cristalino significa la capacidad de un compuesto cristalino de existir en diferentes estructuras cristalinas. El polimorfismo se produce generalmente como respuesta a cambios en temperatura, presión, o ambos. El polimorfismo también puede ser resultado de variaciones en el proceso de cristalización. Los polimorfos se pueden distinguir por diversas características físicas conocidas en la técnica tales como patrones de difracción de rayos X, solubilidad, y punto de fusión. El polimorfismo cristalino puede resultar de diferencias en el empaquetado cristalino (polimorfismo de empaquetado) o diferencias en el empaquetado entre diferentes conformeros de la misma molécula (polimorfismo conformacional). Como se usa en el presente documento, pseudopolimorfismo cristalino significa la capacidad de un hidrato o solvato de un compuesto de existir en diferentes estructuras cristalinas. Los pseudopolimorfos de la presente invención pueden existir debido a diferencias en el empaquetado cristalino (pseudopolimorfismo de empaquetado) o debido a diferencias en el empaquetado entre diferentes conformeros de la misma molécula (pseudopolimorfismo conformacional). La presente invención comprende todos los polimorfos y pseudopolimorfos de los compuestos de Fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables.

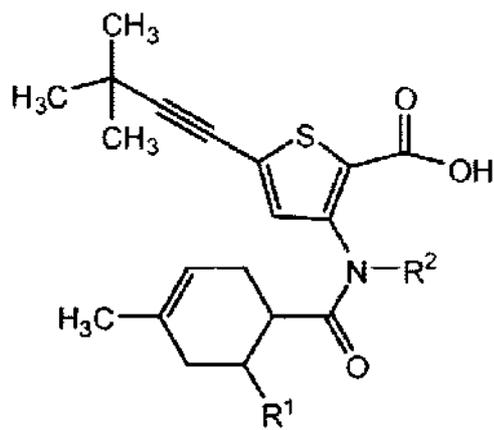
Un compuesto de Fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables también pueden existir en forma de un sólido amorfo. Como se usa en el presente documento, un sólido amorfo es un sólido en el que no existe ningún orden a larga distancia de los átomos en el sólido. Esta definición se aplica también cuando el tamaño cristalino es dos nanómetros o inferior. Se pueden usar aditivos, incluyendo disolventes, para crear las formas amorfas de la presente invención. La presente invención comprende todas las formas amorfas de los compuestos de Fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Ciertos compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros quirales, o pueden ser capaces de existir de otro modo en forma de múltiples estereoisómeros. El alcance de la presente invención incluye mezclas de estereoisómeros así como enantiómeros purificados y mezclas enantioméricamente/ diastereoméricamente enriquecidas. También se incluyen dentro del alcance de la invención los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas de la presente invención, así como cualquier mezcla total o parcialmente equilibrada de los mismos. La presente invención también incluye los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas anteriores en forma de mezclas con isómeros de los mismos en los que se invierten uno o más centros quirales.

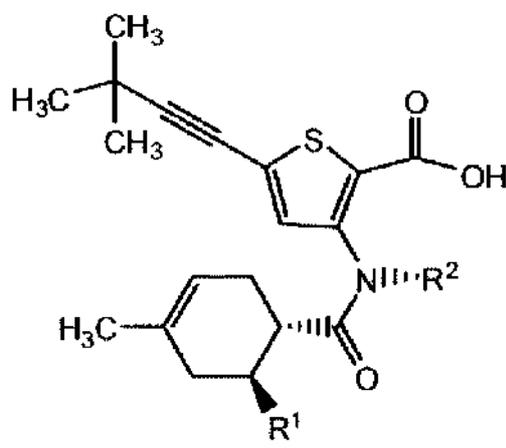
"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales, y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

"Atropisómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que resultan de la rotación impedida alrededor de enlaces individuales en los que la barrera de tensión estérica para la rotación es lo bastante elevada para permitir el aislamiento del conformero individual. Los atropisómeros presentan quiralidad axial. Los atropisómeros se pueden equilibrar térmicamente y la barrera de interconversión se puede medir cinéticamente. La atropisomería se puede producir independientemente de la presencia de otras formas de isomería quiral. De ese modo, como se ilustra, el átomo de nitrógeno representado es plano y el compuesto de Fórmula I es capaz de existir en forma de atropisómeros:

65



En una realización de la presente invención, los compuestos existen en una forma conformérmica de Fórmula Ig:



5

Las definiciones y convenciones estereoquímicas que se usan en el presente documento siguen generalmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

10

La presente invención incluye una sal o solvato de los compuestos que se describen en el presente documento, incluyendo combinaciones de los mismos tales como un solvato de una sal. Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas solvatadas, por ejemplo hidratadas, así como sin solvatar, y la presente invención incluye la totalidad de tales formas.

15

Por lo general, pero no completamente, las sales de la presente invención son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales incluidas dentro de la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de la presente invención.

20

Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales inorgánicas de adición de ácido tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, y nitrato; sales orgánicas de adición de ácido tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glicolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, y ascorbato; sales con aminoácidos ácidos tales como aspartato y glutamato; sales de metales alcalinos tales como sal de sodio y sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de magnesio y sal de calcio; sal de amonio; sales básicas orgánicas tales como sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de dicitohexilamina, y sal de N,N'-dibenciletildiamina; y sales con aminoácidos básicos tales como sal de lisina y sal de arginina. Las sales pueden ser en algunos casos hidratos o solvatos de etanol.

25

30

Los compuestos de la invención también pueden existir en ciertos casos como isómeros tautoméricos. Aunque solo se puede representar una estructura resonante deslocalizada, se incluyen la totalidad de tales formas dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los tautómeros en-amina pueden existir para sistemas de purina, pirimidina, imidazol, guanidina, amidina, y tetrazol y todas sus posibles formas tautoméricas están dentro del alcance de la invención.

35

Los compuestos de Fórmula I también incluyen moléculas que incorporan isótopos de los átomos especificados en las moléculas particulares. Algunos ejemplos no limitantes de estos isótopos incluyen D, T,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .

Grupos protectores

Los grupos protectores están disponibles y se usan y se conocen habitualmente, y se usan opcionalmente para evitar reacciones secundarias con el grupo protegido durante los procedimientos de síntesis, es decir, las rutas o métodos para preparar los compuestos de la invención. La mayor parte de las decisiones en cuanto a qué grupos proteger, cuándo hacerlo, y la naturaleza del grupo protector químico "PG" dependerá de la química de la reacción frente a la que proteger (por ejemplo, condiciones ácidas, básicas, oxidativas, reductoras u otras condiciones) y la dirección deseada de la síntesis. Los grupos PG no necesitan ser, y generalmente no son, los mismos si el compuesto está sustituido con múltiples PG. En general, los PG se usarán para proteger grupos funcionales tales como grupos carboxilo, hidroxilo, tio, o amino y para evitar de ese modo reacciones secundarias o para facilitar de otro modo la eficacia sintética. El orden de desprotección para producir los grupos libres desprotegidos depende de la dirección deseada de la síntesis y las condiciones de reacción que se van a encontrar, y se puede producir en cualquier orden según determine el experto en la materia.

Se pueden proteger diversos grupos funcionales de los compuestos de la invención. Por ejemplo, algunos grupos protectores para grupos -OH (ya sean hidroxilo, ácido carboxílico, ácido fosfónico, u otras funcionalidades) incluyen "grupos formadores de éter o éster". Los grupos formadores de éter o éster son capaces de funcionar como grupos protectores químicos en los esquemas de síntesis que se exponen en el presente documento. Sin embargo, algunos grupos protectores de hidroxilo o tio no son grupos formadores ni de éter ni de éster, como entenderán los expertos en la materia, y se incluyen en las amidas, discutidas posteriormente.

Se describen un gran número de grupos protectores de hidroxilo y grupos formadores de amida y las correspondientes reacciones químicas de escisión en Protective Groups in Organic Synthesis, Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999, ISBN 0-471-16019-9) ("Greene"). Véase también Kocienski, Philip J.; Protecting Groups (Georg Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York, 1994). En particular el Capítulo 1, Grupos protectores: una visión de conjunto, páginas 1-20, el Capítulo 2, Grupos protectores de hidroxilo, páginas 21-94, el Capítulo 3, Grupos protectores de diol, páginas 95-117, el Capítulo 4, Grupos protectores de carboxilo, páginas 118-154, y el Capítulo 5, Grupos protectores de carbonilo, páginas 155-184. Para grupos protectores para ácido carboxílico, ácido fosfónico, fosfonato, ácido sulfónico y otros grupos protectores para ácidos véase Greene como se expone posteriormente. Tales grupos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ésteres, amidas, hidrazidas, y similares.

Grupos protectores formadores de éter y éster

Algunos grupos formadores de éster incluyen: (1) grupos formadores de éster de fosfonato, tales como ésteres de fosfonamido, ésteres de fosforiato, ésteres de fosfonato, y fosfono-bis-amidatos; (2) grupos formadores de éster carboxílico, y (3) grupos formadores de éster de azufre, tales como sulfonato, sulfato, y sulfinato.

Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención se formulan con vehículos y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica convencional. Los comprimidos contendrán excipientes, agentes de deslizamiento, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril, y cuando se destinan al suministro mediante administración distinta de la oral serán generalmente isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes tales como los que se exponen en Handbook of Pharmaceutical Excipients (1986). Algunos excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, carbohidratos tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmeltilcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero es habitualmente aproximadamente de 7 a 10.

Aunque es posible que los principios activos se administren solos, puede ser preferente presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones de la invención, tanto para uso veterinario como para uso humano, comprenden al menos un principio activo, junto con uno o más vehículos aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el receptor de la misma.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Se encuentran técnicas y formulaciones en general en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan mediante puesta en asociación uniforme e íntima del principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, obleas y comprimidos que contienen una cantidad predeterminada del principio activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no

acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede administrar en forma de un bolo, electuario o pasta.

5 Un comprimido se prepara por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos formados por compresión se puede preparar por compresión en una máquina adecuada del principio activo en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar por moldeado en una máquina adecuada de una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o ranurar opcionalmente y se formulan opcionalmente de modo que  
10 proporcionen liberación lenta o controlada del principio activo.

15 Para la administración ocular o a otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las formulaciones se aplican preferentemente en forma de una pomada o crema tópica que contiene el o los principios activos en una cantidad, por ejemplo, de un 0,075 a un 20 % p/p (incluyendo el el o los principios activos en un intervalo entre un 0,1 % y un 20 % en incrementos de un 0,1 % p/p tales como 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), preferentemente de un 0,2 a un 15 % p/p y lo más preferentemente de un 0,5 a un 10 % p/p. Cuando se formulan en forma de una pomada, los principios activos se pueden emplear con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, los principios activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite en agua.

20 Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos un 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y las mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que aumente la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Algunos ejemplos de tales potenciadores de penetración dérmica incluyen  
25 dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

30 La fase aceitosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida por ingredientes conocidos de una forma conocida. Aunque la fase puede comprender únicamente un emulgente (conocido de otra forma como emulsionante), comprende de forma deseable una mezcla de al menos un emulgente con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferentemente, se incluye un emulgente hidrófilo junto con un emulgente lipófilo que actúa como estabilizante. También es preferente incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulgente o emulgentes con o sin estabilizante o estabilizantes componen la denominada cera emulgente, y la cera junto con el aceite y la grasa componen la denominada base de pomada emulgente que forma la fase dispersa aceitosa de las  
35 formulaciones de crema.

Algunos emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico.

40 La selección de los aceites o las grasas adecuados para la formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas. La crema debería ser preferentemente un producto no graso, no colorante y lavable con una consistencia adecuada para evitar la fuga de los tubos u otros recipientes. Se pueden usar ésteres mono o dibásicos es de alquilo de cadena lineal o ramificada tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los tres últimos los ésteres preferentes. Se pueden usar solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se usan lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros  
45 aceites minerales.

50 Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más compuestos de la invención junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en cualquier forma adecuada para el método destinado de administración. Cuando se usan para uso oral, por ejemplo, se pueden preparar comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas o en aceite, polvos o gránulos dispersables,  
55 emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes activos incluyendo agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa. Son aceptables los comprimidos que contienen el principio activo en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o sodio, lactosa, monohidrato de lactosa, croscarmelosa sódica, povidona, fosfato de calcio o sodio; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como celulosa, celulosa microcristalina, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin  
60 revestir o se pueden revestir mediante técnicas conocidas incluyendo microencapsulación para retrasar la disgregación y adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de ese modo una acción sostenida a lo largo de un  
65

período más prolongado. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

5 Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo fosfato de calcio o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio aceitoso, tal como aceite de cacahuate, parafina líquida o aceite de oliva.

10 Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen una gente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga, y agentes de dispersión o humectación tales como fosfatidas de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

20 Las suspensiones aceitosas se pueden formular por suspensión del principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuate, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los que se exponen en el presente documento, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

30 Los polvos y gránulos dispersables de la invención adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectación, un agente de suspensión, y uno o más conservantes. Algunos agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados se muestran a modo de ejemplo mediante los desvelados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuate, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de estos. Algunos agentes emulgentes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, fosfatidas de origen natural, tal como lecitina de haba de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietileno sorbitán. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y emulgentes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, un aromatizante o un agente colorante.

45 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes de dispersión o humectación y los agentes de suspensión adecuados que se han mencionado en el presente documento. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butanodiol o se puede preparar en forma de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se pueden emplear de forma convencional aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar del mismo modo ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

55 La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación temporal destinada para administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo formando compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material de vehículo que puede variar de aproximadamente un 5 aproximadamente un 95 % de la composición total (peso:peso). La composición farmacéutica se puede preparar para proporcionar cantidades fácilmente medibles para la administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de solución con el fin de que se pueda producir una infusión de un volumen adecuado a una tasa de aproximadamente 30 ml/h.

65 Las formulaciones adecuadas para administración ocular incluyen gotas oculares en las que el principio activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el principio activo. El principio activo se presenta preferentemente en tales formulaciones con una concentración de un 0,5 a un 20 %,

ventajosamente de un 0,5 a un 10 % y de forma particular aproximadamente un 1,5 % p/p.

Algunas formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y lavados bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500  $\mu\text{m}$  (incluyendo los tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500  $\mu\text{m}$  en incrementos tales como 0,5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través del conducto nasal o mediante inhalación a través de la boca de modo que alcancen los sacos alveolares. Algunas formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas o aceitosas del principio activo. Algunas formulaciones adecuadas para administración en aerosol o polvo seco se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales y se pueden suministrar con otros agentes terapéuticos tales como los compuestos usados hasta la fecha en el tratamiento o la profilaxis de las infecciones que se describen en el presente documento.

Algunas formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo vehículos tales como los conocidos en la técnica por ser apropiados.

Algunas formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor destinado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las formulaciones se presentan en recipientes de dosis individual o dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales cerrados herméticamente, y se pueden almacenar en condiciones de liofilización (congelado en seco) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferentes son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, como se ha indicado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Se debería entender que además de los ingredientes particulares mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tengan relación con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Los compuestos de la invención también se pueden formular para proporcionar liberación controlada del principio activo que permita una dosificación menos frecuente o mejore el perfil farmacocinético o de toxicidad del principio activo. Por lo tanto, la invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más compuestos de la invención formulados para liberación sostenida o controlada.

La dosis eficaz de un principio activo depende al menos de la naturaleza de la afección que se va a tratar, la toxicidad, si el compuesto se va a usar de forma profiláctica (dosis inferior) o frente a una infección viral activa, el método de suministro, y la formulación farmacéutica, y la determinará el médico usando estudios de escalado de dosis convencionales. Se puede esperar que la dosis eficaz sea de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; habitualmente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; más habitualmente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día; lo más habitualmente, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, la dosis candidata diaria para un adulto humano de aproximadamente 70 kg de peso corporal variará de 1 mg a 1000 mg, preferentemente entre 5 mg y 500 mg, y puede tomar la forma de dosis individuales o múltiples.

#### Rutas de administración

Uno o más compuestos de la invención (denominados en el presente documento principios activos) se administran mediante una ruta apropiada para la afección que se va a tratar. Algunas rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), y similares. Se ha de entender que la ruta preferente puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor. Una ventaja de compuesto de la presente invención es que se encuentra biodisponible por vía oral y se puede dosificar por vía oral.

#### Terapia de combinación, incluyendo terapia de combinación de VHC

En otra realización, los compuestos de la presente invención se pueden combinar con uno o más agentes activos. Algunos ejemplos no limitantes de combinaciones adecuadas incluyen las combinaciones de uno o más compuestos de la presente invención con uno o más interferones, ribavirina o sus análogos, inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, inhibidores de la NS5A, inhibidores de alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, antagonistas de mevalonato  
 5 descarboxilasa, antagonistas del sistema renina-angiotensina, otros agentes antifibróticos, antagonistas de endotelina, inhibidores nucleósidos o nucleótidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores no nucleósidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores de la NS4B del VHC, inhibidores de la entrada y/o el ensamblaje viral, agonistas de TLR-7, inhibidores de ciclofilina, inhibidores del IRES del VHC, potenciadores farmacocinéticos y otros fármacos para tratar VHC; o mezclas de los mismos.

Más específicamente, uno o más compuestos de la presente invención se pueden combinar con uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en

1) interferones, por ejemplo, rIFN-alfa 2 b pegilado (PEG-Intron), rIFN-alfa 2a pegilado (Pegasys), rIFN-alfa 2 b (Intron A), rIFN-alfa 2a (Roferon-A), interferón alfa (MOR-22, OPC-18, Alfaferone, Alfanative, Multiferon, subalín), interferón alfacón-1 (Infergen), interferón alfa-n1 (Wellferon), interferón alfa-n3 (Alferon), interferón-beta (Avonex, DL-8234), interferón-omega (omega DUROS, Biomed 510), albinterferón alfa-2b (Albuferon), IFN alfa XL, BLX- 883 (Locteron), DA-3021, interferón alfa-2b glicosilado (AVI-005), PEG-Infergen, interferón lambda PEGilado (PEGylated IL-29), y belerofón,

2) ribavirina y sus análogos, por ejemplo, ribavirina (Rebetol, Copegus), y taribavirina (Viramidina),  
 3) inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, por ejemplo, boceprevir (SCH-503034 , SCH-7), telaprevir (VX-950), VX-813, TMC-435 (TMC435350), ABT-450, BI-201335, BI-1230, MK-5172, MK-7009 (vaniprevir), SCH-900518, VBY-376, VX-500, GS-9256, GS-9451, BMS-790052, BMS-605339, PHX-1766, AS-101, YH-5258, YH5530, YH5531, y ITMN-191 (R-7227),

4) inhibidores de alfa-glucosidasa 1, por ejemplo, celgosivir (MX-3253), Miglitol, y UT-231 B,  
 5) hepatoprotectores, por ejemplo, emericasán (IDN-6556), ME-3738, GS-9450 (LB-84451), silibilina, y MitoQ,  
 6) inhibidores nucleósidos o nucleótidos de la polimerasa NS5B del VHC y profármacos de los mismos, por ejemplo, GS-6620, R1626, R7128 (R4048), IDX184, IDX-102, PSI-7851, PSI-938, PSI-7977, BCX-4678, valopicitabina (NM-283), y MK-0608,

7) inhibidores no nucleósidos de la polimerasa NS5B del VHC, por ejemplo, filibuvir (PF-868554), ABT-333, ABT-072, BI-207127, VCH-759, VCH-916, JTK-652, MK-3281, VBY-708, VX-222, A848837, ANA-598, GL60667, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, VCH-796 (nesbuvir), GSK625433, BILN-1941, XTL-2125, y GS-9190 (tegobuvir),

8) inhibidores de la NS5A del VHC, por ejemplo, GS-5885, AZD-2836 (A-831), AZD-7295 (A-689), y BMS-790052,  
 9) agonistas de TLR-7, por ejemplo, imiquimod, 852A, GS-9524, GS-9620, ANA-773, ANA-975, AZD-8848 (DSP-3025), PF- 04878691, y SM-360320,

10) inhibidores de ciclofilina, por ejemplo, DEBIO-025, SCY-635, y NIM811,

11) inhibidores del IRES del VHC, por ejemplo, MCI-067,

12) potenciadores farmacocinéticos, por ejemplo, BAS-100, SPI-452, PF-4194477, TMC-41629, GS-9350 (cobicistat), GS-9585, y roxitromicina,

13) otros fármacos para tratar VHC, por ejemplo, timosina alfa 1 (Zadaxin), nitazoxanida (Alinea, NTZ), BIVN-401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilón (CPG-10101), GS-9525, KRN-7000, civacir, GI-5005, XTL-6865, BIT225, PTX-111, ITX2865, TT-033i, ANA 971, NOV-205, tarvacina, EHC-18, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, BMS-650032, BMS-791325, Bavituximab, MDX-1106 (ONO-4538), Oglufanida, FK-788, y VX-497 (merimepodib)

14) antagonistas de mevalonato descarboxilasa, por ejemplo, estatinas, inhibidores de HMGCoA sintasa (por ejemplo, himeglusina), inhibidores de la síntesis de escualeno (por ejemplo, ácido zaragóxico);

15) antagonistas del receptor de angiotensina II, por ejemplo, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, valsartán, telmisartán, eprosartán;

16) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, por ejemplo, captopril, zofenopril, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, fosinopril;

17) otros agentes antifibróticos, por ejemplo, amilorida y

18) antagonistas de endotelina, por ejemplo bosentán y ambrisentán.

En otra realización más, la presente solicitud desvela composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un agente activo adicional, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la presente solicitud proporciona un agente farmacéutico de combinación con dos o más agentes terapéuticos en una forma de dosificación unitaria. De ese modo, es posible combinar cualquier compuesto de la invención con uno o más agentes activos distintos en una forma de dosificación unitaria.

La terapia de combinación se puede administrar en forma de un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

La administración conjunta de un compuesto de la invención con uno o más agentes activos distintos se refiere generalmente a la administración simultánea o secuencial de un compuesto de la invención y uno o más agentes activos distintos, de modo que estén presentes en el cuerpo del paciente las cantidades terapéuticamente eficaces

tanto del compuesto de la invención como de los uno o más agentes activos distintos.

La administración conjunta incluye la administración de las dosificaciones unitarias del compuesto de la invención antes o después de la administración de las dosificaciones unitarias de uno o más agentes activos distintos, por ejemplo, la administración de los compuestos de la invención en segundos, minutos, u horas de la administración de uno o más agentes activos distintos. Por ejemplo, se puede administrar en primer lugar una dosis unitaria de un compuesto de la invención, seguido en segundos o minutos de la administración de una dosis unitaria de uno o más agentes activos distintos. Alternativamente, se puede administrar en primer lugar una dosis unitaria de uno o más agentes activos distintos, seguido de la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención en segundos o minutos. En algunos casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de un compuesto de la invención en primer lugar seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de uno o más agentes activos distintos. En otros casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de uno o más agentes activos distintos en primer lugar seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y "efecto sinérgico", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se usan conjuntamente es mayor que la suma de los efectos que resulta del uso de los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se formulan conjuntamente o se administran o suministran simultáneamente en una formulación combinada; (2) se suministran mediante alternación o en paralelo en forma de formulaciones distintas; o (3) mediante cualquier otro régimen. Cuando se suministran en terapia alternación, se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, en comprimidos, píldoras o cápsulas distintas, o mediante diferentes inyecciones en jeringas distintas. En general, durante la terapia de alternación, se administra secuencialmente, es decir en serie, una dosificación eficaz de cada principio activo, mientras que en la terapia de combinación, se suministran conjuntamente dosificaciones eficaces de dos o más principios activos.

Como entenderán los expertos en la materia, cuando se trata una infección viral tal como VHC, tal tratamiento se puede caracterizar de diversas formas y medir mediante diversos puntos finales.

### 30 Ejemplos de síntesis

Se usan ciertas abreviaturas y acrónimos en la descripción de los detalles experimentales. Aunque los expertos en la materia deberían entender la mayoría de estos, la Tabla 1 contiene una lista de muchas de estas abreviaturas y acrónimos.

35

Tabla 1. Lista de abreviaturas y acrónimos

Abreviatura	Significado
DCM	diclorometano
°C	grados Celsius
DMSO	dimetilsulfóxido
DMF	dimetilformamida
EtOAc	acetato de etilo
h o hr	horas
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
LDA	diisopropilamida de litio
MeOH	metanol
Min	minutos
m/z	proporción de masa con respecto a carga
MH+	masa más 1
MH-	masa menos 1
EM o ms	espectro de masas
Ph	fenilo
ta o t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético

TLC o tic cromatografía en capa fina  
 δ partes por millón campo bajo del tetrametilsilano

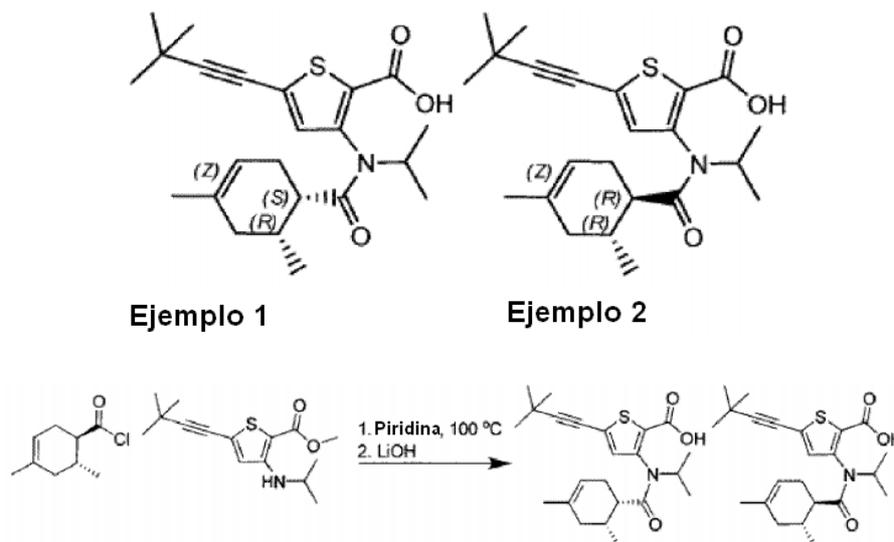
Los compuestos de esta invención se pueden sintetizar mediante métodos similares a los que se describen en los documentos de Patente WO2011031669 y US20110020278.

5 Los nombres de los compuestos y las asignaciones estereoquímicas del presente documento se generaron usando ChemBioDraw Ultra™ versión 11.0.

A menos que se especifique otra cosa, los tiempos de retención se refieren a un método de HPLC analítica que usa un gradiente de 2-98 % de acetonitrilo (que contiene un 0,05 % de ácido trifluoroacético) en agua (que contiene un 0,05 % de ácido trifluoroacético) durante 5 minutos con un caudal de 2 ml/min en una columna Fenomenex Gemini (5 μ, 80A, 50 x 4,6 mm).

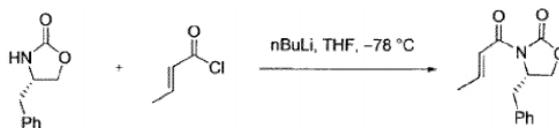
### Ejemplos específicos

15 **Ejemplos 1 y 2 - Ácido**  
5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1S,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico y ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico

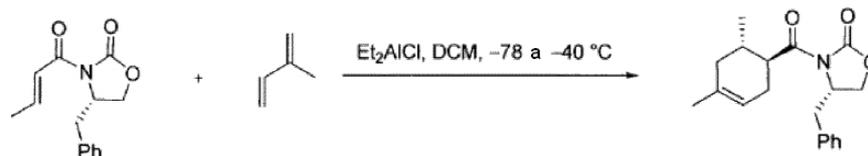


20 Una solución de 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(isopropilamino)tiofeno-2-carboxilato de metilo (140 mg, 0,5 mmol) en 1 ml de piridina se trató con cloruro de (1R,6R)-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxilato (172 mg, 1 mmol) y se calentó durante 16 h a 100 °C en un tubo cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna preempacada de 4 g, eluyendo con 0-20 % de hexano:etilacetato) para separar la mezcla resultante de diastereómeros. El primer pico en eluir, 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1S,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxilato de metilo, se trató con LiOH (5 eq, THF/ agua 1:1) y se purificó por HPLC para dar el Ejemplo 1, ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1S,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico: EM (m/z): 403,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 8,72 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con un 0,05 % de ácido trifluoroacético). El segundo pico en eluir, 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxilato de metilo, se trató con LiOH (5 eq, THF/ agua 1:1) y se purificó por HPLC para dar el Ejemplo 2, ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,6R)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico: EM (m/z): 403,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 8,62 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con un 0,05 % de ácido trifluoroacético).

Síntesis de cloruro de ácido (1R,6R)-4,6-dimetil-ciclohex-3-enocarboxílico



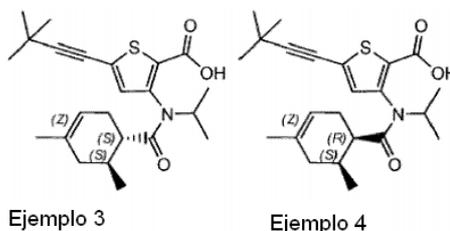
- Se disolvió (S)-4-benciloxazolidin-2-ona (35 g, 0,2 mol) en THF (500 ml) y se enfrió a -78 °C. A esta solución se añadió gota a gota una solución de nBuLi en hexanos (80 ml, 0,2 mol). La solución se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se añadió lentamente cloruro de (E)-but-2-enoilo (19 ml, 0,2 mol). El baño refrigerante se retiró y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la finalización de la reacción, se añadió solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl para interrumpir la reacción. La mayoría del THF se retiró por destilación al vacío y la mezcla se repartió entre éter y solución salina saturada. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fase orgánica se concentró para dar el producto bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (20 % de EtOAc en hexanos) para dar el producto (39 g, 79 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco.



- Una solución de (S,E)-4-bencil-3-but-2-enoiloxazolidin-2-ona (34,5 g, 0,14 mol) e isopreno (250 ml) en DCM se enfrió a -78 °C. A esta solución se añadió gota a gota una solución de Et<sub>2</sub>AlCl en tolueno (100 ml, 0,18 mol). La solución se calentó a -40 °C y se agitó a esta temperatura durante una noche. Tras la finalización de la reacción, se añadió solución 2 N de HCl (150 ml) para interrumpir la reacción. La mayoría del DCM se retiró por destilación al vacío y la mezcla se extrajo con éter. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fase orgánica combinada se concentró para dar el producto bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-30 % de EtOAc en hexanos) para dar el producto (39 g, 88 % de rendimiento) en forma de un sólido cristalino de color blanco. Las etapas posteriores para generar el cloruro de ácido deseado se llevarán a cabo de una forma similar a las descritas para la síntesis de cloruro de ácido de (1S,6S)-4,6-dimetil-ciclohex-3-enocarboxílico (véase posteriormente).

### Ejemplos 3 y 4

- Ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1S,6S)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico y ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,6S)-N-isopropil-4,6-dimetilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico



- Estos compuestos se sintetizaron de una forma similar a los Ejemplos 1 y 2, partiendo de cloruro de ácido (1S,6S)-4,6-dimetil-ciclohex-3-enocarboxílico.

### Ejemplo 3:

- LC/EM = 403 (M<sup>+</sup>+1)  
 Tiempo de retención: 2,46 min  
 LC: HPLC Thermo Electron Surveyor  
 EM: Espectrómetro de Masas Finnigan LCQ Advantage MAX  
 Columna: fenomenex Polar RP 30 mm x 4,6 mm  
 Disolventes: Acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico, Agua con 0,1 % de ácido fórmico  
 Gradiente: 0 min-0,1 min 5 % de ACN, 0,1 min-1,95 min 5 %-100 % de ACN, 1,95 min-3,5 min 100 % de ACN, 3,5 min-3,55 min 100 %-5 % de ACN, 3,55 min-4 min 5 % de ACN.

**Ejemplo 4:**LC/EM = 403 (M<sup>+</sup>+1)

Tiempo de retención: 2,54 min

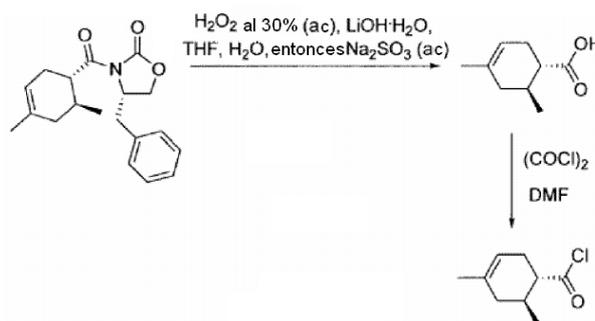
5 LC: HPLC Thermo Electron Surveyor

EM: Espectrómetro de Masas Finnigan LCQ Advantage MAX

Columna: fenomenex Polar RP 30 mm x 4,6 mm

Disolventes: Acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico, Agua con 0,1 % de ácido fórmico

10 Gradiente: 0 min-0,1 min 5 % de ACN, 0,1 min-1,95 min 5 %-100 % de ACN, 1,95 min-3,5 min 100 % de ACN, 3,5 min-3,55 min 100 %-5 % de ACN, 3,55 min-4 min 5 % de ACN.

Síntesis de cloruro de ácido (1S,6S)-4,6-dimetil-ciclohex-3-enocarboxílico

15

Se disolvió 4S-bencil-3-(4,6S-dimetil-ciclohex-3-eno-1S-carbonil)-oxazolidin-2-ona, preparado mediante un método similar al que se describe en J. Am. Chem. Soc. 110(4), 1988, 1238-1256, en THF (1000 ml) y H<sub>2</sub>O (350 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió lentamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (36 ml, 354 mmol) seguido de LiOH·H<sub>2</sub>O (9,90 g, 263 mmol) en una porción. Se permitió que la reacción se calentara lentamente a ta y se agitó durante 16 h. A continuación, la reacción se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (60 g, 472 mmol) en H<sub>2</sub>O (400 ml) y se añadió muy lentamente a la mezcla de reacción enfriada. La solución se agitó durante 1 h, y las fases se separaron. Los extractos orgánicos se retiraron a presión reducida. La fase acuosa se añadió de vuelta al concentrado orgánico y la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 ml). El pH de la fase acuosa se ajustó a 2 mediante adición lenta de HCl acuoso concentrado. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (4 x 300 ml) y los extractos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La retirada de los componentes orgánicos a presión reducida y la evaporación conjunta con hexanos proporcionó ácido (1S,6S)-4,6-dimetil-ciclohex-3-enocarboxílico (14,14 g, 78 %) en forma de un sólido de color blanco.

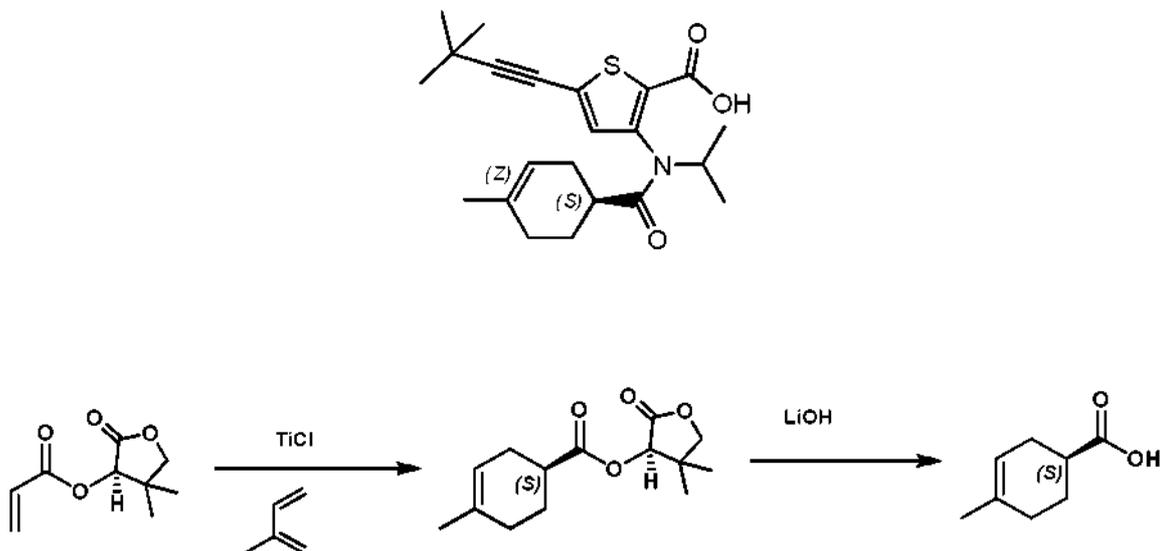
20

25

30

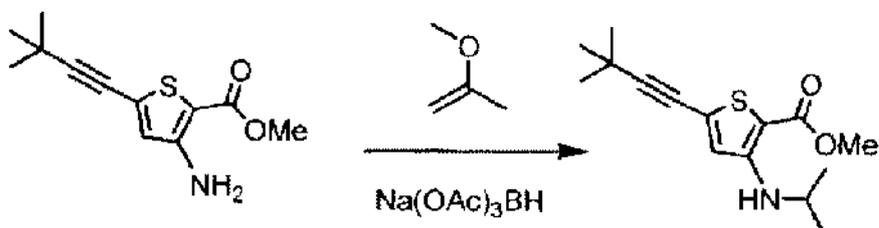
Se disolvió ácido 4,6-S-dimetil-ciclohex-3-eno-1S-carboxílico (944 mg, 6,17 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se añadió DMF (20 µl). La solución se enfrió a 0 °C y a continuación se añadió lentamente (COCl)<sub>2</sub> (700 µl, 7,38 mmol). La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora y a continuación se concentró. El residuo se recogió en hexanos y se concentró; esta evaporación conjunta en hexanos se repitió una vez más. El cloruro de ácido resultante se usó sin purificación adicional.

35

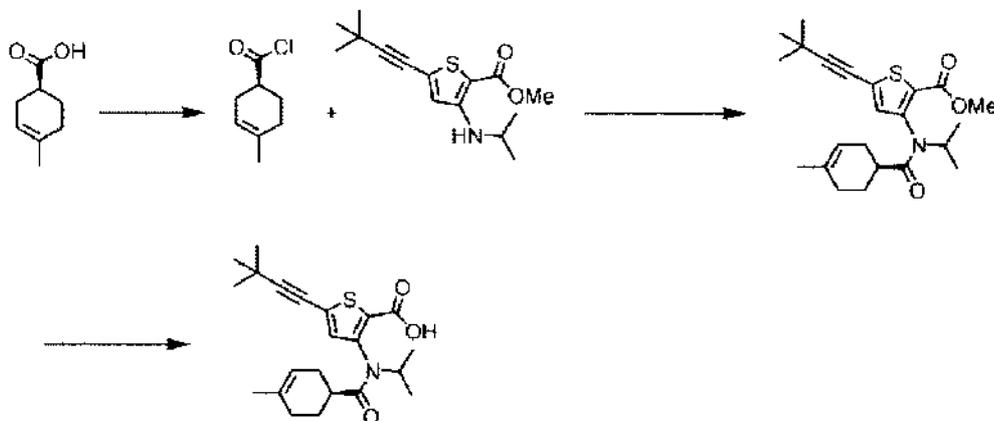
**Ejemplo 5 - Ácido (S)-5-(3,3-dimetilbut-1-ynil)-3-(N-isopropil-4-metilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico**

Se enfrió éster de 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido acrílico (*R*) (2,92 g, 15,9 mmol) en diclorometano (20 ml) y hexanos (3 ml) a -10 °C y se trató con tetracloruro de titanio (2,4 ml, 2,4 M en diclorometano, 2,4 mmol). La solución de color rojo se agitó durante 15 min y se trató con isopreno (2,4 ml, 23,8 mmol) gota a gota durante 5 min. Después de agitar durante 1,1 h, se añadió una porción adicional de isopreno (2,4 ml, 23,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó de -10 a 0 °C durante 2,2 h. Después de enfriar a -10 °C, la mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio (sat. ac.). Se añadieron agua y acetato de etilo: hexanos (1:1). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo:hexanos (1:1). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (10-40 % de EtOAc:Hex, columna de 80 g) para proporcionar 3,35 g (84 % de rendimiento) de éster de 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido 4-metil-ciclohex-3-(*S*)-enocarboxílico en forma de un aceite transparente.

Se trató éster de 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido 4-metil-ciclohex-3-(*S*)-enocarboxílico (3,34 g, 13,2 mmol) en THF (25 ml), agua (2,5 ml) y metanol (2,5 ml) con monohidrato de hidróxido de litio (2,8 g, 66,2 mmol) y se calentó a 50 °C con agitación. Después de 1 h, la mezcla de reacción se trató con HCl 1 M (aproximadamente 25 ml). La mezcla se extrajo con hexanos:acetato de etilo (200 ml: 15 ml), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró hasta 2,4 g de un semisólido de color blanco. El residuo se disolvió de nuevo en hexanos:diclorometano (100 ml, 95:5), se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró hasta 1,68 g (91 % de rendimiento) de ácido 4-metil-ciclohex-3-enocarboxílico (*S*) en forma de un polvo de color blanco.



Se puso 3-amino-5-(3,3-dimetilbut-1-inil)tiofeno-2-carboxilato de metilo (véase el documento de Patente WO 2008058393) (12,0 g, 50,6 mmol) en diclorometano (150 ml) en un baño de agua fría (12 °C) y se trató gota a gota con 2-metoxiprop-1-eno (14,6 ml, 152 mmol) durante aproximadamente 6 minutos seguido de ácido acético (8,7 ml) durante aproximadamente 5 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (16,1 g, 152 mmol) en porciones durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La solución de color naranja claro resultante se vertió en bicarbonato sódico frío (sat ac, 200 ml). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (150 ml cada uno). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con bicarbonato sódico (sat ac) y solución salina saturada, se secaron sobre sulfato sódico (anhidro), se filtraron y se concentraron hasta un aceite de color naranja. La cromatografía sobre gel de sílice (0 - 15 % de EtOAc:Hex) proporcionó 13,0 g (92 % de rendimiento) del 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(isopropilamino)tiofeno-2-carboxilato de metilo deseado en forma de un aceite de color amarillo claro que solidificó después de un periodo de reposo en un sólido cristalino ceroso, y se usó en la etapa posterior.



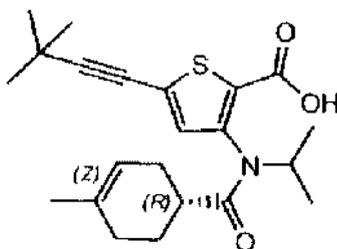
Se secó azeotrópicamente ácido (*S*) 4-metil-ciclohex-3-enocarboxílico (100 mg, 0,71 mmol) por evaporación a partir de tolueno, se trató con fosfato tribásico de potasio (303 mg, 2,1 mmol), se suspendió en diclorometano (2 ml) y se trató con dimetilformamida (1 gota). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató gota a gota con cloruro de oxalilo (0,2 ml, 1,4 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 h. Después de filtrar los sólidos, la solución se concentró, se trató con hexanos y se concentró de nuevo para proporcionar cloruro de (*S*) 4-metil-ciclohex-3-enocarboxílico en forma de un aceite de color amarillo claro que se usó

inmediatamente en la siguiente etapa.

Se suspendieron cloruro de (S) 4-metil-ciclohex-3-enocarboxilo (0,71 mmol), 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(isopropilamino)tiofeno-2-carboxilato de metilo (80 mg, 0,29 mmol) y fosfato tribásico de potasio (152 mg, 0,71 mmol) en dicloroetano (0,75 ml), se cerraron herméticamente con un tapón y se calentaron a 90 °C. Después de 16 h, la mezcla de reacción se enfrió y se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. La cromatografía ultrarrápida (10-35 % de EtOAc:Hexanos) proporcionó 59 mg (51 % de rendimiento) del (S)-5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(N-isopropil-4-metilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxilato de metilo deseado en forma de una espuma de color blanco.

Se disolvió (S)-5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(N-isopropil-4-metilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxilato de metilo (123 mg, 0,31 mmol) en THF (2 ml). Se añadieron agua (0,5 ml), metanol (0,5 ml) e hidróxido de litio (129 mg, 3,1 mmol). La mezcla se cerró herméticamente y se calentó a 45 °C durante 30 min. Después de un periodo adicional de 1 h a temperatura ambiente, la mezcla se trató con HCl al 10 % (hasta que el pH fue menor que 3) y se repartió entre agua y acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico (anhidro) y el residuo se purificó por HPLC en fase inversa para dar el compuesto del título, 41 mg (35 % de rendimiento): EM (m/z): 388,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 4,59 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético).

#### 20 **Ejemplo 6 - Ácido (R)-5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-(N-isopropil-4-metilciclohex-3-enocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico**

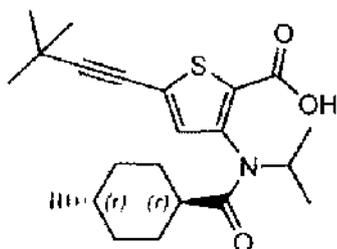


El compuesto del título se preparó de una forma similar al Ejemplo 5 usando éster de (S) 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido acrílico en lugar de éster de (R) 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido acrílico: EM (m/z): 388,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 4,59 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético).

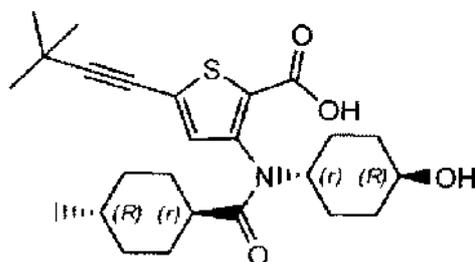
Se preparó éster de (R) 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido acrílico de la siguiente forma: una solución de 3-(S)-hidroxi-4,4-dimetil-dihidro-furan-2-ona (2,60 g, 20 mmol) y diisopropiletilamina (5,2 ml, 30 mmol) en diclorometano (25 ml) se enfrió a -10 °C, se trató gota a gota con cloruro de acrilóilo (2,03 ml, 25 mmol) y se agitó durante 2 h. Se añadió HCl 1 M (20 ml) y la fase orgánica se lavó con bicarbonato sódico y agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (10-40 % de EtOAc, hexanos) proporcionó 2,09 g (57 % de rendimiento) del éster de (R) 4,4-dimetil-2-oxo-tetrahydro-furan-3-ilo del ácido acrílico deseado en forma de un aceite transparente.

#### Ejemplos comparativos

Ejemplo	Comparativo	1	-	Ácido
40	5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1r,4r)-N-isopropil-4-metilciclohexanocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico			



La síntesis del compuesto del título se describe en el documento de Patente WO 2006/072347 (Ejemplo 1).

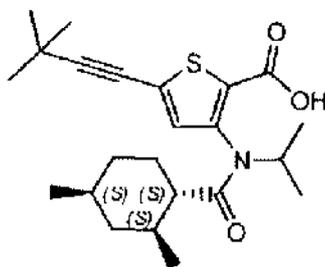
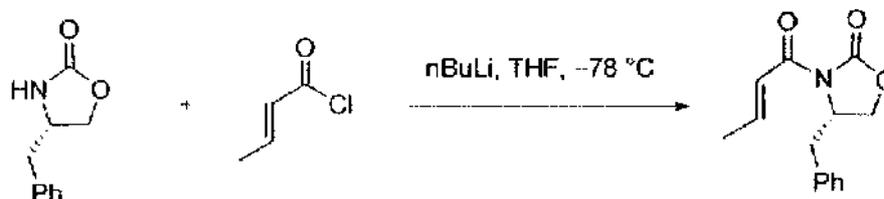
Ejemplo Comparativo 2 - Ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1*r*,4*R*)-*N*-((1*r*,4*R*)-4-hidroxiciclohexil)-4-metilciclohexano-carboxamido)tiofeno-2-carboxílico

5

La síntesis del compuesto del título se describe en el documento de Patente WO08/58393 (ejemplo 1).

Ejemplo Comparativo 3 - Ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1*S*,2*S*,4*S*)-*N*-isopropil-2,4-dimetilciclohexano-carboxamido)tiofeno-2-carboxílico

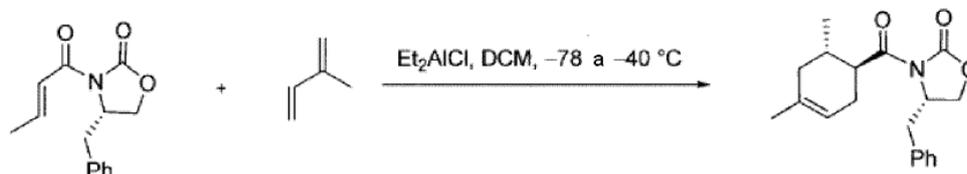
10

Síntesis de ácido (1*S*,2*S*,4*S*)-2,4-dimetilciclohexanocarboxílico

15

Se disolvió (S)-4-benciloxazolidin-2-ona (35 g, 0,2 mol) en THF (500 ml) y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota una solución de nBuLi en hexano (80 ml, 0,2 mol). La solución se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se añadió lentamente cloruro de (E)-but-2-enoilo (19 ml, 0,2 mol). El baño de refrigeración se retiró y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h, tras lo cual se añadió solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (200 ml). La mayoría del THF se retiró al vacío y la mezcla se repartió entre éter y solución salina saturada. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fase orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (20 % de EtOAc en hexanos) para dar el producto deseado (39 g, 79 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco.

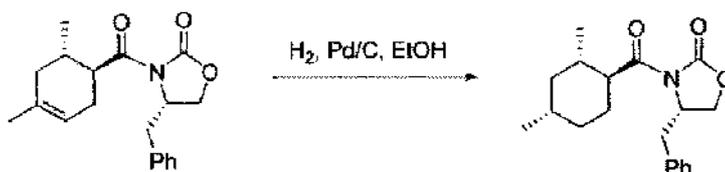
20



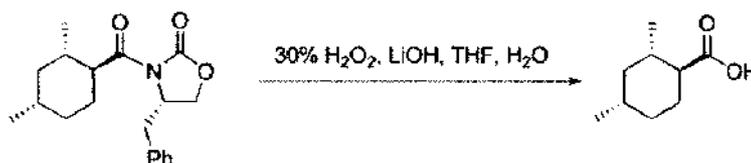
25

Una solución de (S,E)-4-bencil-3-but-2-enoiloxazolidin-2-ona (34,5 g, 0,14 mol) e isopreno (250 ml) en DCM se enfrió a -78 °C. A esta solución se añadió una solución de Et<sub>2</sub>AlCl en tolueno (100 ml, 0,18 mol) gota a gota. La solución se calentó a -40 °C y se agitó a esta temperatura durante una noche. Se añadió solución 2 N de HCl (150 ml). La mayoría del DCM se retiró al vacío y la mezcla se extrajo con éter. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fase orgánica combinada se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-30 % de EtOAc en hexanos) para dar el producto deseado (39 g, 88 % de rendimiento) en forma de un sólido cristalino de color blanco.

30

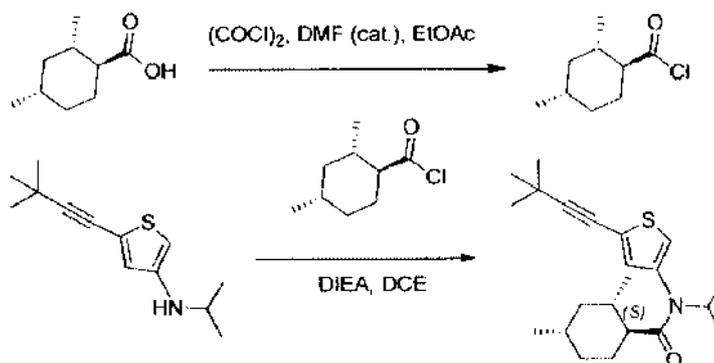


Una mezcla de (S)-4-bencil-3-((1S,6S)-4,6-dimetilciclohex-3-enocarbonyl)oxazolidin-2-ona (6 g, 19,1 mmol) y Pd al 10 %/C (500 mg) en EtOH (50 ml) en atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de tierra de diatomeas y se concentró para dar una mezcla 3:1 de diastereómeros, que se separaron por cromatografía en columna quiral preparativa (Chiralcel OD-H (20 cm x 250 cm; semiprep): tiempo de retención: 24 min, 33 min (mayoritario) (80:20 heptano: etanol)), para proporcionar (S)-4-bencil-3-((1S,2S,4S)-2,4-dimetilciclohexanocarbonyl)oxazolidin-2-ona (2,3 g, 38 %).

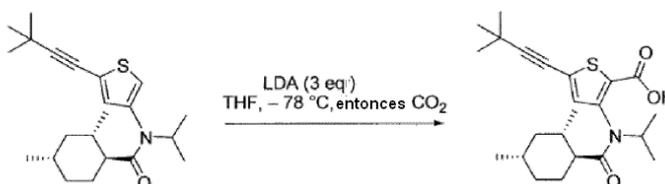


A 0 °C, a una solución de (S)-4-bencil-3-((1S,2S,4S)-2,4-dimetilciclohexanocarbonyl)oxazolidin-2-ona (1,5 g, 4,75 mmol) en THF (30 ml) y agua (10 l) se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (3,7 ml) gota a gota seguido de la adición de monohidrato de hidróxido de litio (0,4 g, 9,5 mmol) en una porción. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió lentamente Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (6 g) en agua (20 ml) a 0 °C, seguido de NaHCO<sub>3</sub> saturado (15 ml). El THF se retiró al vacío. El residuo se extrajo con DCM (2 x 25 ml). Los extractos combinados se extrajeron de nuevo con NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 ml). El pH de las fases acuosas combinadas se ajustó a pH=1 con HCl concentrado. La mezcla acuosa se extrajo a continuación con EtOAc (5 x 25 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró para dar el producto en bruto (0,76 g) en forma de un sólido de color blanco, que se usó sin purificación adicional.

#### Síntesis de ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-ynil)-3-((1S,2S,4S)-N-isopropil-2,4-dimetilciclohexanocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico

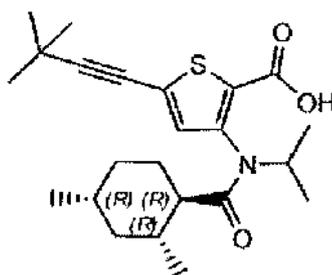


A una solución de ácido carboxílico (200 mg, 1,3 mmol) y DMF (1 gota) en EtOAc (5 ml) se añadió cloruro de oxalilo (0,3 ml, 3,45 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 2 h y los componentes volátiles se retiraron al vacío. A continuación se añadió una solución de 5-(3,3-dimetilbut-1-ynil)-N-isopropiltiofen-3-amina (170 mg, 0,77 mmol) y DIEA (0,3 ml) en DCE (1 ml). La reacción se agitó durante una noche. La mezcla se vertió en EtOAc (150 ml), y los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 50 ml) y solución salina saturada (50 ml). Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fase orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-20 % de EtOAc en hexanos) para dar el producto deseado (116 mg, 25 % de rendimiento) en forma de un aceite oscuro.



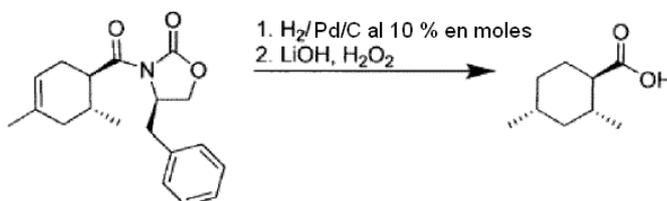
La amida de la etapa previa (116 mg, 0,32 mmol, 1,0 eq) se disolvió en THF (5 ml) en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 ml. La solución se enfrió a -78 °C en un baño de acetona-hielo seco. A esta solución, se añadió gota a gota LDA (0,5 ml, 0,96 mmol, 3,0 eq) mediante una jeringa mientras se mantenía la temperatura interna inferior a -70 °C. Después de la adición, la solución se agitó a -78 °C durante 2 h. Se hizo burbujear CO<sub>2</sub> en la solución durante 3 min. Se añadió 1,0 ml de IPA a la reacción seguido de 30 ml de ácido cítrico al 10 %. La mezcla se vertió en EtOAc (100 ml) y las fases orgánicas se lavaron con ácido cítrico al 10 % (2 x 30 ml) y solución salina saturada (100 ml). Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado hasta sequedad al vacío, el residuo se purificó por HPLC en fase inversa para producir el producto (45 mg, 34 % de rendimiento). EM (m/z): 404,5 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 5,18 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético).

Ejemplo Comparativo 4 - Ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,2R,4R)-N-isopropil-2,4-dimetilciclohexanocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico



Se preparó ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-inil)-3-((1R,2R,4R)-N-isopropil-2,4-dimetil-ciclohexanocarboxamido)tiofeno-2-carboxílico de una forma similar al Ejemplo 27 excepto por que se usó ácido (1R,2R,4R)-2,4-dimetilciclohexanocarboxílico en lugar de ácido (1S,2S,4S)-2,4-dimetilciclohexanocarboxílico. EM (m/z): 404,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención por HPLC 8,75 min (2-98 % de acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético).

Síntesis de ácido (1R,2R,4R)-2,4-dimetilciclohexanocarboxílico



Una mezcla de (R)-4-bencil-3-((1R,6R)-4,6-dimetilciclohex-3-eno-carbonilo)oxazolidin-2-ona (1,5 g, 4,8 mmol) (J. Am. Chem. Soc. 110(4), 1988, 1238-1256) en EtOH (24 ml) y Pd/C al 10 % (500 mg) se agitó en una atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de tierra de diatomeas y se concentró para dar una mezcla 3:1 de diastereómeros que se separaron por cromatografía en columna quiral preparativa: Chiral-Pak AD-H (20 cm x 250 cm; semiprep): tiempo de retención: 5,11 min, 6,25 min (heptano: etanol 80:20), para proporcionar el compuesto deseado (R)-4-bencil-3-((1R,2R,4R)-2,4-dimetilciclohexanocarboxamido)oxazolidin-2-ona (0,65 g).

Una solución de (R)-4-bencil-3-((1R,2R,4R)-2,4-dimetilciclohexanocarboxamido)oxazolidin-2-ona (0,65 g, 2,0 mmol) en THF/ agua (3:1, 20 ml) se enfrió en un baño de hielo y se añadió lentamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (1 ml, 16,5 mmol), seguido de LiOH·H<sub>2</sub>O (s) (0,17 g, 4,0 mmol) en una porción. Se permitió que la reacción se calentara lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. A continuación, la reacción se enfrió en un baño de hielo. Se añadió muy lentamente una solución 1 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a la mezcla de reacción enfriada. La solución se agitó durante 1 h, y las fases se separaron. Los extractos orgánicos se retiraron a presión reducida. La fase acuosa se añadió de nuevo al concentrado orgánico y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 ml). El pH de la solución acuosa se ajustó a 2 mediante la adición lenta de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (1 x 50 ml) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los disolventes se retiraron a presión reducida, y se evaporaron conjuntamente con hexanos, para proporcionar 0,300 g de ácido (1R,2R,4R)-2,4-dimetilciclohexanocarboxílico en forma de un sólido de color blanco.

## Ejemplos biológicos

### Actividad antiviral

- 5 En el presente documento se desvelan métodos de inhibición de infecciones virales, que comprenden la etapa de tratar una muestra o un sujeto que se sospecha tiene necesidad de tal inhibición con una composición de la invención.

En el contexto de la invención, las muestras que se sospecha que contienen un virus incluyen materiales naturales o hechos por el hombre tales como organismos vivos; tejidos y cultivos celulares; muestras biológicas tales como  
 10 muestras de material biológico (sangre, suero, orina, fluido cefalorraquídeo, lágrimas, esputo, saliva, muestras de tejido, y similares); muestras de laboratorio; muestras de alimentos, agua, o aire; muestras de bioproductos tales como extractos de células, particularmente células recombinantes que sintetizan una glicoproteína deseada; y similares. Por lo general, se sospechará que la muestra contiene un organismo que induce una infección viral, frecuentemente un  
 15 organismo patógeno tal como un virus tumoral. Las muestras pueden estar contenidas en cualquier medio incluyendo agua y mezclas de disolvente orgánico/agua. Las muestras incluyen organismos vivos tales como seres humanos, y materiales hechos por el hombre tales como cultivos celulares.

Si se desea, la actividad antiviral de un compuesto de la invención se puede observar después de la aplicación de la composición mediante cualquier método que incluye métodos directos e indirectos de detección de tal actividad. Se  
 20 contemplan todos los métodos cuantitativos, cualitativos, y semicuantitativos de determinación de tal actividad. Por lo general, se aplica uno de los métodos de análisis sistemático descrito anteriormente aunque, sin embargo, también es aplicable cualquier otro método tal como observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo.

La actividad antiviral de un compuesto de la invención se puede medir usando protocolos de análisis sistemático  
 25 convencionales que se conocen. Por ejemplo, la actividad antiviral de un compuesto se puede medir usando los siguientes protocolos generales.

### Ensayo de inmunodetección de Flavivirus basado en células

30 Se tripsinizaron, se contaron y se diluyeron células BHK21 o A549 hasta  $2 \times 10^5$  células/ml en medio Hams F-12 (células A549) o medio RPMI-1640 (células BHK21) complementado con un 2 % suero bovino fetal (FBS) y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Se dispensaron  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos transparentes y se colocaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante una noche. Al día siguiente, las células se infectaron con  
 35 virus con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,3 en presencia de diversas concentraciones de los compuestos de ensayo durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante otras 48 horas. Las células se lavan una vez con PBS y se fijan con metanol frío durante 10 min. Después de lavar dos veces con PBS, las células fijadas se bloquean con PBS que contiene un 1 % de FBS y un 0,05 % de Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añade la solución de anticuerpo primario (4G2) a una concentración de 1:20 a 1:100 en PBS que contenía un 1 % de FBS y un  
 40 0,05 % de Tween-20 durante 3 horas. A continuación las células se lavaron tres veces con PBS seguido de una incubación de una hora con IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma, dilución 1:2000). Después de lavar tres veces con PBS, se añaden a cada pocillo 50 microlitros de la solución sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma) durante dos minutos. La reacción se detiene mediante la adición de ácido sulfúrico 0,5 M. Las placas se leen a una absorbancia de 450 nm para la cuantificación de la carga viral. Después de la medida, las células se lavaron tres veces con PBS seguido de incubación con yoduro de propidio durante 5 min. La  
 45 placa se lee en un lector Tecan Safire™ (excitación a 537 nm, emisión a 617 nm) para la cuantificación del número de células. Se dibujan las curvas de respuesta a dosis a partir de la absorbancia media frente al logaritmo de la concentración de los compuestos de ensayo. El valor de CE<sub>50</sub> se calcula mediante análisis de regresión no lineal. Se puede usar un control positivo tal como N-nonil-desoxinojirimicina.

### 50 Ensayo de efecto citopático de Flavivirus basadas células

Para el ensayo frente al virus del Nilo Occidental o el virus de la encefalitis japonesa, se tripsinizaron células BHK21 y se diluyeron hasta una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI-1640 complementado con un 2 % de FBS y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Para el ensayo frente al virus del dengue, se tripsinizaron células Huh7 y se  
 55 diluyeron hasta una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml en medio DMEM complementado con un 5 % de FBS y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Se dispensaron 50 microlitros por pocillo de suspensión de células ( $2 \times 10^4$  células) en placas basadas en polímero de fondo óptico de 96 pocillos (Nunc). Las células se hicieron crecer durante una noche en el medio de cultivo a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, y a continuación se infectaron con el virus del Nilo Occidental (por ejemplo la cepa B956) o el virus de la encefalitis japonesa (por ejemplo la cepa Nakayama) con una MOI = 0,3, o con  
 60 virus del dengue (por ejemplo la cepa DEN-2 NGC) con una MOI = 1, en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo. Las placas que contenían los virus y los compuestos se incubaron adicionalmente a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Al final de la incubación, se añaden 100 microlitros de reactivo CellTiter-Glo™ a cada pocillo. Los contenidos se mezclan durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis de las células. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia. La lectura de  
 65 luminiscencia se registra usando un lector de placas. Se puede usar un control positivo tal como N-nonil-desoxinojirimicina.

**Actividad antiviral en un modelo de ratón de infección por dengue**

Se ensayaron compuestos *in vivo* en un modelo de ratón de infección por virus del dengue (Schul *et al.* J. Infectious Dis. 2007; 195:665-74). Se alojaron en jaulas ventiladas de forma individual ratones AG129 (B&K Universal Ltd, Hill, UK) de seis a diez semanas de edad. Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,4 ml de suspensión de virus del dengue 2 TSV01. Se tomaron muestras de sangre mediante punción retro orbital con anestesia de isoflurano. Las muestras de sangre se recogen en tubos que contienen nitrato sódico hasta una concentración final de un 0,4 %, y se centrifugan inmediatamente durante 3 minutos a 6000 g para obtener el plasma. El plasma (20 microlitros) se diluye en 780 microlitros de medio RPMI-1640 y se congela instantáneamente en nitrógeno líquido para el análisis de ensayo de placa. El plasma restante se reserva para la determinación del nivel de citoquina y proteína NS1. Los ratones desarrollan viremia de dengue que surge durante varios días, mostrando un pico en el día 3 posterior a la infección.

Para el ensayo de la actividad antiviral, se disuelve un compuesto de la invención en un fluido de vehículo, por ejemplo un 10 % de etanol, un 30 % de PEG 300 y un 60 % de D5 W (5 % de dextrosa en agua; o HCl 6 N (1,5 eq): NaOH 1 N (se ajustó el pH a 3,5): tampón citrato 100 mM a pH 3,5 (0,9 % v/v:2,5 % v/v: 96,6 % v/v). Los treinta y seis ratones AG129 de 6-10 semanas de edad se dividen en seis grupos de seis ratones cada uno. Todos los ratones se infectan con virus del dengue como se ha descrito anteriormente (día 0). El grupo 1 se dosifica mediante administración oral de 200 ml/ratón con 0,2 mg/kg de un compuesto de la invención dos veces al día (una vez temprano por la mañana y una vez al final de la tarde) durante tres días consecutivos comenzando en el día 0 (primera dosis justo antes de la infección por dengue). Los grupos 2, 3 y 4 se dosifican de la misma forma con 1 mg/kg, 5 mg/kg y 25 mg/kg del compuesto, respectivamente. Se puede usar un control positivo, tal como (2R,3R,4R,5R)-2-(2-amino-6-hidroxi-purin-9-il)-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofurano-3,4-diol, dosificado mediante administración oral de 200 microlitros/ratón de la misma forma que los grupos anteriores. Se trata un grupo adicional solamente con fluido de vehículo.

En el día 3 posterior a la infección se extraen muestras de sangre de aproximadamente 100 microlitros (anticoaguladas con citrato sódico) de los ratones mediante punción retro-orbital con anestesia de isoflurano. Se obtiene el plasma de cada muestra de sangre mediante centrifugación y congelación instantánea en nitrógeno líquido para el análisis de ensayo de placa. Las muestras de plasma recogidas se analizan mediante ensayo de placa como se describe en Schul *et al.* También se analizan citoquinas como describe Schul. Se analizan los niveles de proteína NS1 usando un kit Platelia™ (BioRad Laboratories). El efecto antiviral se indica mediante la reducción en los niveles de citoquina y/o los niveles de proteína NS1.

Por lo general, se obtienen reducciones en la viremia de aproximadamente 5-100 veces, más habitualmente 10-60 veces, lo más habitualmente 20-30 veces, con dosificaciones bid de 5-50 mg/kg de los compuestos de la invención.

**Protocolo de ensayo de VHC**

La actividad anti-VHC de los compuestos de la presente invención se sometió a ensayo en la línea celular Huh-7 de hepatoma humano que alberga un replicón de VHC. El ensayo comprendió las siguientes etapas:

Etapa 1: preparación de compuesto y dilución seriada

Se llevó a cabo la dilución seriada en DMSO al 100 % en una placa de 384 pocillos. Se preparó una solución que contenía un compuesto a una concentración de 225 veces la concentración de la dilución seriada final de partida en DMSO al 100 % y se añadieron 15 µl a los pocillos especificados previamente en la columna 3 o 13 de una placa de 384 pocillos de polipropileno. El resto de la placa de 384 pocillos se llenó con 10 µl de DMSO al 100 % excepto las columnas 23 y 24, donde se añadieron 10 µl de un inhibidor de proteasa del VHC 500 µM (ITMN-191) en DMSO al 100 %. El inhibidor de proteasa del VHC se usó como control del 100 % de inhibición de la replicación del VHC. La placa se colocó a continuación en una estación de trabajo Biomek FX para comenzar la dilución seriada. La dilución seriada se llevó a cabo en diez ciclos de dilución a 3 veces de la columna 3 a 12 o de la columna 13 a 22.

Etapa 2: preparación de la placa de cultivo celular y adición del compuesto

Se añadieron a cada pocillo de una placa de 384 pocillos de polipropileno de color negro 90 µl de medio celular que contenía 1600 células de replicón del VHC Huh-7 suspendidas con una estación de trabajo Biotek uFlow. Se transfirió un volumen de 0,4 µl de la solución de compuesto desde la placa de diluciones seriadas a la placa de cultivo celular en una estación de trabajo Biomek FX. La concentración de DMSO en las condiciones de ensayo finales fue un 0,44 %. Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad.

Etapa 3: detección de citotoxicidad e inhibición de la replicación viral

a) Evaluación de la citotoxicidad: se aspiró el medio en la placa de cultivo celular de 384 pocillos con un lavador de placas Biotek EL405. Se añadió a cada pocillo de la placa un volumen de 50 µl de una solución que contenía

Calceína AM 400 nM en PBS al 100 % con una estación de trabajo Biotek uFlow. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de que se y diera la señal de fluorescencia (emisión de 490 nm, excitación de 520 nm) con un lector de placas Perkin Elmer Envision.

5 b) Evaluación de la inhibición de la replicación viral: se aspiró la solución de calceína-PBS en la placa de cultivo celular de 384 pocillos con un lavador de placas Biotek EL405. Se añadió a cada pocillo de la placa un volumen de 20 µl de tampón de luciferasa Dual-Glo (Promega, Reactivo de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo, nº de cat. E298B) con una estación de trabajo Biotek uFlow. La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió a cada pocillo de la placa un volumen de 20 µl de una solución que contenía una mezcla 1:100 de Dual-Glo Stop & sustrato Glo (Promega, Reactivo de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo, nº de cat. E313B) y 10 Dual-Glo Stop & tampón Glo (Promega, Reactivo de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo, nº de cat. E314B) con una estación de trabajo Biotek uFlow. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que se midiera la señal de luminiscencia con un lector de placas Perkin Elmer Envision.

15 Etapa 4: cálculo

El porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante la conversión de calceína AM en un producto fluorescente. La señal de fluorescencia promedio de los pocillos de control de DMSO se definió como un 100 % no tóxica. La señal de fluorescencia individual del pocillo tratado con compuesto de ensayo se dividió por la señal promedio de los pocillos de control de DMSO y a continuación se multiplicó por un 100 % para obtener el porcentaje de viabilidad. El porcentaje de actividad de replicación anti-VHC se determinó mediante la señal de fluorescencia del pocillo de ensayo en comparación con los pocillos de control de DMSO. La señal de fondo se determinó mediante la señal de luminiscencia promedio de los pocillos tratados con inhibidor de proteasa del VHC y se restó de la señal de los pocillos de ensayo así como de los pocillos de control de DMSO. Después de diluciones seriadas 3 veces, se calcularon los valores de CE<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> por ajuste del % de inhibición en cada concentración mediante la siguiente ecuación:

25 
$$\% \text{ de inhibición} = 100 \% / [(CE_{50}/[I])^b + 1]$$

30 Donde b es el coeficiente de Hill. Véase, para referencia, Hill, A. V., The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Hæmoglobin on its Dissociation Curves, J. Physiol. 40: iv-vii. (1910).

Los valores del % de inhibición a una concentración específica, por ejemplo 2 µM, también se pueden derivar de la fórmula anterior.

35 Cuando se sometieron a ensayo, se descubrió que ciertos compuestos de la presente invención inhiben la replicación viral como se indica en la Tabla 1:

Tabla 1

Ejemplos	CE <sub>50</sub> de tipo silvestre (nM)
1	8
2	5
3	5
4	38
5	10
6	7
Ejemplo comparativo 1	26
Ejemplo comparativo 2	6
Ejemplo comparativo 3	50
Ejemplo comparativo 4	8

40 **Protocolo de ensayo de transfección transitoria de VHC**

*Líneas celulares.* Se obtuvo Huh-lunet, un clon de Huh-7 que es altamente permisivo para la replicación del VHC, en ReBLikon GmbH (Mainz, Alemania). Las células Huh-lunet se mantuvieron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Carlsbad, CA) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT). Las células se mantuvieron a 37 °C en incubadoras humidificadas (85 % de humedad) y en una atmósfera de un 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Determinación de la susceptibilidad al fármaco usando ensayo de replicón de transfección transitoria.** Se usó PI-hRluc, un replicón bicistrónico que codifica el gen de luciferasa de Renilla corriente abajo del IRES de la polio y los genes (NS3 - NS5B) no estructurales del VHC de genotipo 1 b (cepa Con-1) corriente arriba del IRES del EMCV, para los estudios de transfección transitoria. Se generó el plásmido pPI-hRluc a partir del plásmido pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET, que codifica un replicón subgenómico de genotipo 1 b (cepa Con-1) y se obtuvo en ReBLikon {11239}. El gen hRluc se amplificó por PCR a partir de pF9 CMV hRluc-neo Flexi(R) (Promega, Madison, WI) mediante PCR usando Accuprime Super Mix I (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los cebadores PV\_Rluc\_Top y 3'-Rluc(NotI). Estos dos cebadores tienen las siguientes secuencias y portan los sitios de restricción para la clonación posterior: PV\_Rluc\_Top: 5' ATC AGA CAA TTG TAT CAT AAT GGC TTC CAA GGT GTA CG 3'; 3'-Rluc(NotI): 5' ACG TCA CTA TCT ACG CGG CCG CTT ACT GCT CGT TCT TC3' (sitio de NotI subrayado). El promotor T7, 5'UTR y el IRES del Virus de la Polio se amplificaron por PCR a partir del plásmido pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET usando los cebadores 5'-P7(SbfI) y PV\_Rluc\_Bottom. Estos dos cebadores tienen las siguientes secuencias y portan los sitios de restricción para la clonación posterior: 5'-P7(SbfI): 5' CAA GCT AAG CTG CCT GCA GG T 3' (sitio de SbfI subrayado); PV\_Rluc\_Bottom: 5' CGT ACA CCT TGG AAG CCA TTA TGA TAC AAT TGT CTG AT. Los fragmentos de PCR posteriores de las dos reacciones anteriores se unieron conjuntamente a continuación usando superposición por PCR y los cebadores 5'- P7(SbfI) y 3'-Rluc(NotI). El producto de amplificación P7-5'UTR-IRES de Polio Virus-hRluc completado se subclonó en pCR2,1-TOPO. El plásmido resultante se digirió con SbfI y NotI, y el fragmento escindido (P7-5'UTR-IRES de Polio Virus-hRluc) se ligó usando T4 ADN ligasa en pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET digerido con las mismas enzimas. El vector resultante, pPI-hRluc, se secuenció para confirmar la orientación correcta y la secuencia de la región P75'UTR-IRES de Polio Virus-hRluc del plásmido. Se introdujo la mutación NS5B M423T en un plásmido que codifica el replicón PI-hRluc usando un kit de mutagénesis QuikChange II XL, siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene La Jolla, CA). La mutación se confirmó por secuenciación del ADN. Los ARN del replicón se transcribieron *in vitro* a partir del plásmido que codifica el replicón usando un kit MEGAscript (Ambion, Austin, TX). El ARN se transfectó a las células Huh1unet usando el método de Lohmann *et al.* En resumen, las células se tripsinizaron y se lavaron dos veces con PBS. Se mezcló una suspensión de  $4 \times 10^6$  células en 400  $\mu$ l de PBS con 5  $\mu$ g de ARN y se sometió a electroporación usando los ajustes de 960  $\mu$ F y 270 V. Las células se transfirieron a 40 ml de medio de cultivo calentado previamente y a continuación se sembraron en placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l/pocillo). Los compuestos se diluyeron en serie 3 veces en DMSO al 100 % y se añadieron a las células a una dilución 1:200, para conseguir una concentración final de DMSO de un 0,5 % en un volumen total de 200  $\mu$ l/pocillo. Las células se trataron durante tres días después de lo cual se retiró el medio de cultivo, se lisaron las células, y se cuantificó la actividad de luciferasa de Renilla usando un ensayo disponible en el mercado (Promega) y un instrumento Top Count (Perkin Elmer, Waltham, MA).

**Análisis de datos.** Los datos se convirtieron en porcentajes con respecto a los controles sin tratar (definidos como el 100 %), y se calcularon los valores de CE<sub>50</sub> mediante regresión no lineal de dos conjuntos de datos duplicados usando el software XLfit 4 (IDBS, Emeryville, CA). Se calcularon los cambios de resistencia a la multiplicación como la proporción del valor de CE<sub>50</sub> del replicón mutante con respecto al de tipo salvaje. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

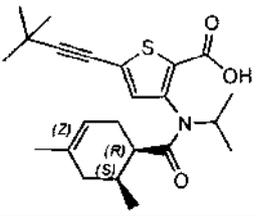
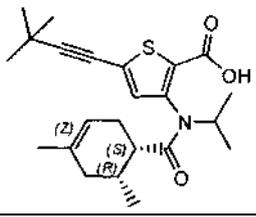
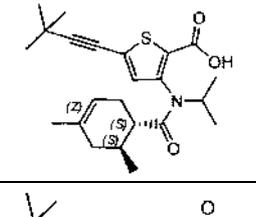
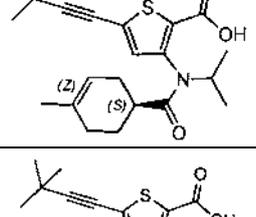
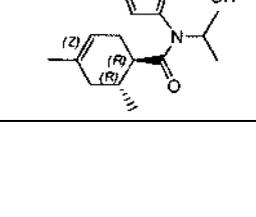
Ejemplo	CE <sub>50</sub> de transfección transitoria de replicón (nM)		
	tipo salvaje	M423T	Cambio de multiplicador
3	5	14	2,7
6	8	40	5,2
Ejemplo comparativo 1	26	293	12
Ejemplo comparativo 2	10	343	35

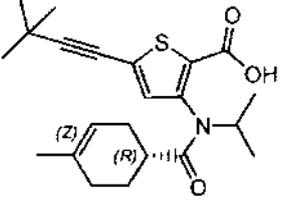
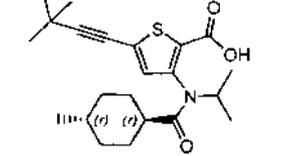
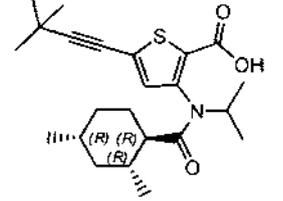
#### 40 Medidas definidas de unión

Como se entenderá, las medidas directas de la afinidad de unión proporcionan un método sensible para determinar la interacción de un fármaco de molécula pequeña con los bolsillos de unión de las proteínas estrechamente relacionadas, y por lo tanto los efectos de las sutiles modificaciones estructurales sobre los efectos inhibidores comparativos. Los métodos que se describen a continuación y los resultados indicados en la Tabla 3 demuestran que los compuestos de la presente invención no solo presentan afinidades de unión similares o mejoradas al NS5B de tipo salvaje, sino que la presencia de la insaturación en el anillo de ciclohexenilo de Fórmula I en combinación con el sustituyente metilo añadido confiere una sorprendente retención de la afinidad de unión frente al mutante M423T, que se genera en la clínica tras el tratamiento de pacientes infectadas crónicamente por VHC con inhibidores del sitio del pulgar II de NS5A temprano (Wagner, F., Thompson, R. *et al.*, Antiviral Activity of the Hepatitis C Virus Polymerase Inhibitor Filibuvir in Genotype 1 Infected Patients, *Hepatology*, 2011; Jiang, M., Ardzinski, A. *et al.*, Characterization of HCV variants selected in genotype 1 patients who received 3 day monotherapy with VX-222, a non-nucleoside polymerase inhibitor, 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses, septiembre de 2010, Yokohama, Japón). Los compuestos con una mínima diferencia de multiplicador en la afinidad de unión pueden tener una utilidad clínica particular.

Los estudios in vitro con NS5B emplearon formas solubles truncadas en C-terminal del resto 21 de la proteína NS5b (aminoácidos 1 - 570; GT-1b; tipo salvaje y mutante M423T. Véase Hung, M., Wang, R., Liu, X.: 'Preparation of HCV NS3 and NS5B to support small molecule drug discovery', Current Protocols in Pharmacology, 2011, en publicación). Se usó Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR) para medir la afinidad de unión de los compuestos que se describen en el presente documento a los constructos de proteína. Se empleó un acoplamiento convencional de amina para unir la proteína a la superficie de un chip sensor Biacore CM5 usando tampón acetato sódico 10 mM a pH 5,5 hasta un nivel de inmovilización de ~2500 RU. Los experimentos se llevaron a cabo usando un sistema Biacore T100 a 25 °C en tampón de procesamiento (Hepes 50 mM a pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM, P20 al 0,01 %, DMSO al 5 %). Los compuestos se sometieron a ensayo en una serie de dilución de tres veces de concentración para 8 concentraciones partiendo de 162 nM, usando una fase de asociación de 60 segundos y una fase de disociación de 5 minutos a un caudal de 100 µl min<sup>-1</sup>. Al final de cada ciclo de unión, se usó una inyección de 3 segundos de un tampón (tetraborato disódico 10 mM, NaCl 1 M, pH 8,5) a 40 µl min<sup>-1</sup> como etapa de regeneración para retirar los compuestos aún unidos a la superficie de NS5B. Los datos de respuesta se procesaron usando el siguiente procedimiento: inyecciones alineadas en las direcciones X e Y, doble referencia usando tanto una superficie de referencia como inyecciones de tampón, y corrección de DMSO para efectos de volumen excluidos. Los datos procesados se analizaron usando análisis no lineal por mínimos cuadrados con un ajuste global de un modelo de unión 1:1 con transporte de masa. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplo	Estructura	K <sub>d</sub> de tipo salvaje (nM)	K <sub>d</sub> de M423T (nM)	Diferencia de multiplicador
4		6,5	18,5	2,9
1		1,4	7,7	5,6
3		0,7	4,2	6,0
5		1,5	13,7	9,0
2		2,8	26,8	95

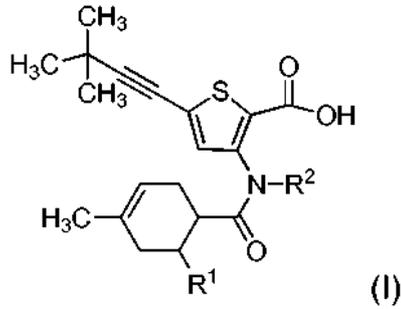
6		1,3	14,3	11
Ejemplo comparativo 1		1,7	27,8	16
Ejemplo comparativo 4		3,6	144,1	40

Las respuestas farmacológicas específicas observadas pueden variar de acuerdo con y dependiendo del compuesto activo particular seleccionado o de si existen vehículos farmacéuticos presentes, así como del tipo de formulación y modo de administración empleado, y tales variaciones o diferencias esperadas en los resultados se contemplan de acuerdo con la práctica de la presente invención.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:

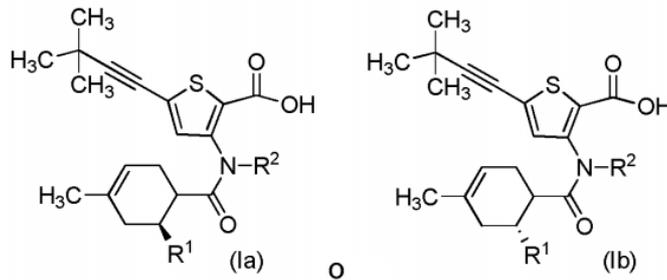


5

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

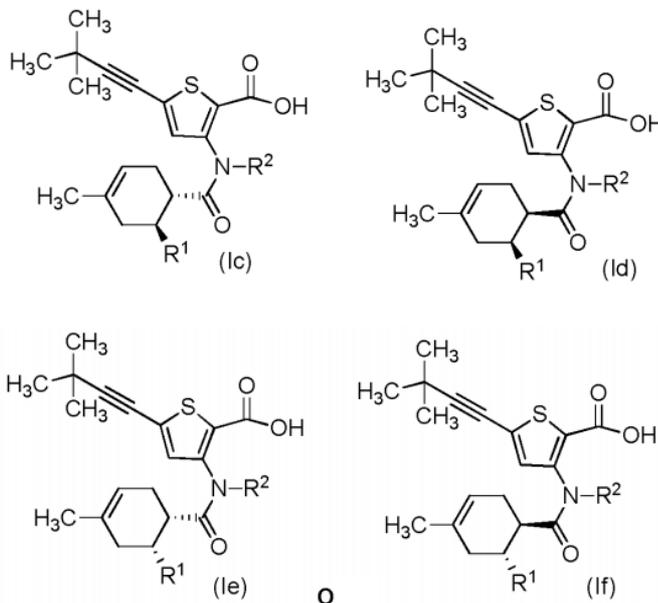
- 10  $R^1$  es H o metilo; y  
 $R^2$  es alquilo  $C_1$ - $C_6$ ;  
 en el que cada alquilo representa una cadena lineal o ramificada.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib)



15

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ic), (Id), (Ie) o (If):

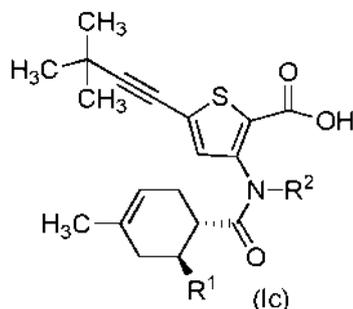


20

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que  $R^1$  es H.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R<sup>1</sup> es metilo.

6. El compuesto de la reivindicación 3, que es un compuesto de fórmula (Ic):



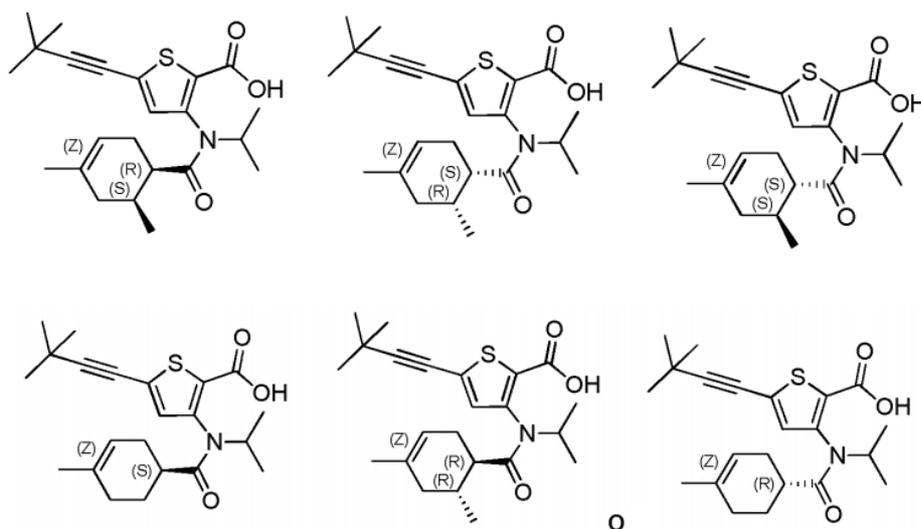
5

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R<sup>2</sup> es isopropilo.

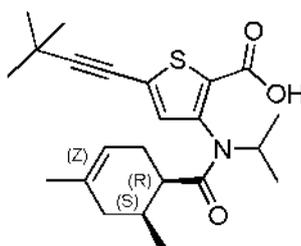
10

8. El compuesto de la reivindicación 1, que es



15 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

9. El compuesto de la reivindicación 1, que es:



20

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

25

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en interferones, ribavirina o sus análogos, inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, inhibidores de la NS5A, inhibidores de alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, antagonistas de

- mevalonato descarboxilasa, antagonistas del sistema renina-angiotensina, antagonistas de endotelina, otros agentes antifibróticos, inhibidores nucleósidos o nucleótidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores no nucleósidos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores de la NS4B del VHC, inhibidores de la entrada y/o del ensamblaje viral, agonistas de TLR-7, inhibidores de ciclofilina, inhibidores del IRES del VHC, potenciadores farmacocinéticos y otros fármacos para tratar el VHC; o mezclas de los mismos.
- 5
12. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección viral por *Flaviviridae*.
- 10 13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la Hepatitis C.
14. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la Hepatitis C.
- 15
15. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en terapia médica.