

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 350**

51 Int. Cl.:

C07D 491/052 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013 PCT/US2013/041201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13726936 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2850085**

54 Título: **Compuestos antiviricos inhibidores de NS5A de HCV**

30 Prioridad:

16.05.2012 US 201261647966 P

14.03.2013 US 201313831116

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

LINK, JOHN O.;
COTTELL, JEROMY J.;
TREJO MARTIN, TERESA ALEJANDRA y
BACON, ELIZABETH M.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 628 350 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos antivíricos inhibidores de NS5A de HCV

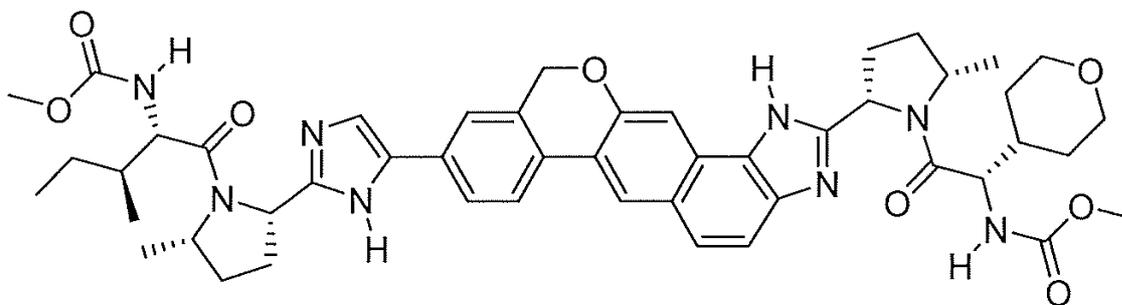
5 **Antecedentes**

La hepatitis C está reconocida como una enfermedad vírica crónica del hígado, que se caracteriza por enfermedad hepática. Aunque los fármacos dirigidos al hígado están en amplio uso y han demostrado eficacia, la toxicidad y otros efectos secundarios han limitado su utilidad. Los inhibidores del virus de la hepatitis C (HCV) son útiles para
10 limitar el establecimiento y la progresión de una infección por HCV, así como en ensayos de diagnóstico para el HCV.

Existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos contra el HCV. En particular, existe la necesidad de agentes terapéuticos contra el HCV que tengan amplia actividad contra los genotipos de HCV (por ejemplo, los genotipos 1a,
15 1b, 2a, 3a, 4a). También existe una necesidad particular de agentes que sean menos susceptibles a resistencia vírica. Se han descrito mutaciones de resistencia contra inhibidores para NS5A de HCV para los genotipos 1a y 1b en Antimicrobial Agents and Chemotherapy, septiembre de 2010, volumen 54, pág. 3641-3650.

20 **Sumario**

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la hepatitis C (HCV). En una realización, la composición comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar el HCV. En una realización, el agente terapéutico se selecciona de ribavirina, un inhibidor de la proteasa NS3, un inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV, un inhibidor de la alfa-glucosidasa 1, un hepatoprotector, un inhibidor no nucleosídico de la polimerasa de HCV o combinaciones de los mismos. En una
35 realización, la composición comprende adicionalmente un inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV. En una realización, el inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV se selecciona de ribavirina, viremídina, levovirina, un L-nucleósido o isatoribina.

40 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en este documento y al menos un inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende adicionalmente un interferón, un interferón pegilado, ribavirina o combinaciones de los mismos. En una realización, el inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV es sofosbuvir. En una realización, se proporciona una
45 composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en este documento y al menos un inhibidor de la proteasa NS3 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende adicionalmente sofosbuvir.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un interferón o interferón pegilado.

50 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un análogo nucleosídico.

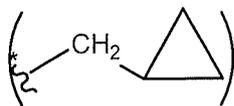
55 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica en la que dicho análogo nucleosídico se selecciona de ribavirina, viremídina, levovirina, un L-nucleósido e isatoribina y dicho interferón es interferón- α o interferón- α pegilado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la hepatitis C o un trastorno asociado a la hepatitis C.

5 Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a determinadas realizaciones de la divulgación, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la divulgación se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no está previsto que la divulgación se limite a esas realizaciones.

10 "Alquilo" es un hidrocarburo C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos son, metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (*i*-Pr, *i*-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (*i*-Bu, *i*-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (*s*-Bu, *s*-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (*t*-Bu, *t*-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃) y ciclopropilmetilo



25 "Ariilo" se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono obtenido por la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales obtenidos a partir de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

30 El término "amino," como se usa en el presente documento, se refiere a -NH₂.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

35 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

40 "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 propiedades físicas diferentes, *por ejemplo*, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereoisómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución, tal como, por ejemplo, electroforesis y cromatografía.

45 "Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

El término "tratamiento" o "tratar", en la medida en que se relaciona con una enfermedad o afección incluye prevenir la aparición de la enfermedad o afección, inhibir la enfermedad o afección, eliminar la enfermedad o afección y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

50 Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas 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. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, *es decir*, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos (D y L) o (R y S) se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos *d* y *l* o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) o *l* que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o *d* es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse enantiómero y una mezcla de tales isómeros se denomina a menudo, mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como una mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción

química. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica. La divulgación incluye todos los estereoisómeros de los compuestos descritos en el presente documento.

5 Profármacos

El término "profármaco" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que cuando se administra a un sistema biológico genera un compuesto de la descripción que inhibe la actividad del HCV ("el compuesto inhibidor activo"). El compuesto puede formarse a partir del profármaco como un resultado de: (i) reacción o reacciones químicas espontáneas, (ii) reacción o reacciones químicas catalizadas con enzima, (iii) fotólisis, y/o (iv) reacción o reacciones químicas metabólicas.

"Resto profármaco" se refiere a un grupo funcional lábil que se separa del compuesto inhibidor activo durante el metabolismo, sistemáticamente, dentro de una célula, por hidrólisis, escisión enzimática o por algún otro proceso (Bundgaard, Hans, "Design and Application of Prodrugs" en A Textbook of Drug Design and Development (1991), P. Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Eds. Harwood Academic Publishers, págs. 113-191). Las enzimas que son capaces de un mecanismo de activación enzimática con los compuestos profármacos de la divulgación incluyen, pero sin limitación, amidasas, esterases, enzimas microbianas, fosfolipasas, colinesterasas y fosfasas. Los restos profármaco pueden servir para aumentar la solubilidad, absorción y lipofiliidad para optimizar la liberación, biodisponibilidad y eficacia del fármaco. Un resto de profármaco puede incluir un metabolito activo o el propio fármaco.

Los restos de profármacos a modo de ejemplo incluyen los ésteres de aciloximetilo hidrolíticamente sensibles o lábiles $-\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{99}$ y carbonatos de aciloximetilo $-\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^{99}$ en los que R^{99} es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ sustituido, arilo $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ sustituido. El éster de aciloxialquilo se usó por primera vez como una estrategia de profármaco para ácidos carboxílicos y después se aplicó a fosfatos y fosfonatos por Farquhar et al. (1983) J. Pharm. Sci. 72: 324; también por las Patentes de Estados Unidos n.º 4816570, 4968788, 5663159 y 5792756. Posteriormente, el éster de aciloxialquilo se usó para suministrar ácidos fosfónicos a través de las membranas celulares y para aumentar la biodisponibilidad oral. Una variante próxima del éster aciloxialquílico, el éster de alcóxicarboniloxialquilo (carbonato), puede también aumentar la biodisponibilidad oral como un resto de profármaco en los compuestos de las combinaciones de la divulgación. Un éster de aciloximetilo a modo de ejemplo es pivaloiloximatoxi, (POM)- $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$. Un resto de profármaco de carbonato de aciloximetilo a modo de ejemplo es pivaloiloximetilcarbonato (POC) $-\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

35 Grupos Protectores

En el contexto de la presente divulgación, los grupos protectores incluyen restos profármacos y grupos protectores químicos.

"Grupo protector" se refiere a un resto de un compuesto que enmascara o altera las propiedades de un grupo funcional o las propiedades del compuesto en su conjunto. Los grupos protectores químicos y las estrategias para la protección/desprotección son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Protective Groups in Organic Chemistry, Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991. Los grupos protectores se utilizan a menudo para enmascarar la reactividad de ciertos grupos funcionales, para ayudar en la eficacia de las reacciones químicas deseadas, *por ejemplo*, la fabricación y la ruptura de enlaces químicos de una manera ordenada y planificada. La protección de grupos funcionales de un compuesto altera otras propiedades físicas además de la reactividad del grupo funcional protegido, tal como, *por ejemplo*, la polaridad, lipofiliidad (hidrofobicidad) y otras propiedades que pueden medirse mediante herramientas analíticas comunes. Los productos intermedios protegidos químicamente pueden ser biológicamente activos o inactivos.

Los compuestos protegidos también pueden presentar alteraciones, y en algunos casos, propiedades optimizadas *in vitro* e *in vivo*, tal como, *por ejemplo*, paso a través de las membranas celulares y resistencia a la degradación o secuestro enzimático. En este papel, los compuestos protegidos con efectos terapéuticos pretendidos pueden denominarse profármacos. Otra función de un grupo protector es convertir el fármaco precursor en un profármaco, por lo que el fármaco precursor se libera tras la conversión del profármaco *in vivo*. Debido a que los profármacos activos pueden absorberse más eficazmente que el fármaco precursor, los profármacos pueden poseer una mayor potencia *in vivo* que el fármaco precursor. Los grupos protectores se retiran, ya sea *in vitro*, en el caso de los intermedios químicos, o *in vivo*, en el caso de los profármacos. Con los intermedios químicos, no es particularmente importante que los productos resultantes después de la desprotección, *por ejemplo*, alcoholes, sean fisiológicamente aceptables, aunque en general es más deseable si los productos son farmacológicamente inocuos.

Los grupos protectores están disponibles, son comúnmente conocidos se usan opcionalmente para prevenir reacciones secundarias con el grupo protegido durante procedimientos sintéticos, es decir, rutas o métodos para preparar los compuestos de la divulgación. En su mayor parte, la decisión de qué grupos proteger, cuando hacerlo y la naturaleza del grupo protector químico "PG" dependerá de la química de la reacción a proteger contra (*por ejemplo*, condiciones ácidas, básicas, oxidativas, reductoras u otras) y la dirección deseada de la síntesis. Los PG

no necesitan ser, y generalmente no son, iguales si el compuesto está sustituido con múltiples PG. En general, se usará un PG para proteger grupos funcionales, tales como, por ejemplo, carboxilo, hidroxilo, tio o grupos amino y por tanto previene reacciones secundarias o por otra parte facilitan la eficacia sintética. El orden de desprotección para producir grupos desprotegidos libres depende de la dirección pretendida de la síntesis y las condiciones de reacción que se produzcan y puede ocurrir en cualquier orden determinada por el experto.

Pueden protegerse varios grupos funcionales de los compuestos de la divulgación. Por ejemplo, los grupos protectores para los grupos -OH (ya sean hidroxilo, ácido carboxílico, ácido fosfónico u otras funciones) 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 sintéticos expuestos en el presente documento. Sin embargo, algunos grupos protectores de hidroxilo y tio no son grupos formadores de éter ni de éster, como comprenderán los expertos en la materia, y se incluyen con amidas, se discuten más adelante.

Un muy gran número de grupos protectores de hidroxilo y grupos formadores de amida, y sus correspondientes reacciones de escisión química, se describe en Protective Groups in Organic Synthesis, Theodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991, ISBN 0-471-62301-6) ("Greene"). Véase también Kocienski, Philip J.; Protecting Groups (Georg Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York, 1994). En particular Capítulo 1, Protecting Groups: An Overview, páginas 1-20, Capítulo 2, Hidroxil Protecting Groups, páginas 21-94, Capítulo 3, Diol Protecting Groups, páginas 95-117, Capítulo 4, Carboxil Protecting Groups, páginas 118-154, Capítulo 5, Carbonil Protecting Groups, 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 más adelante.

Estereoisómeros

Los compuestos de la divulgación pueden tener centros quirales, *por ejemplo*, átomos de carbono o fósforo quirales. Los compuestos de la divulgación incluyen, por lo tanto, todos los estereoisómeros, que incluyen enantiómeros, diastereómeros y atropisómeros. Además, los compuestos de la divulgación incluyen isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o todos los átomos aquirales, asimétricos. En otras palabras, los centros quirales aparentes de las representaciones se proporcionan como las mezclas no racémicas o racémicas. Ambas mezclas racémicas y diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales aislados o sintetizados, sustancialmente libre de sus socios enantioméricos o diastereoméricos, están todos dentro del alcance de la divulgación. Las mezclas racémicas se separan en sus isómeros individuales sustancialmente ópticamente puros a través de técnicas bien conocidas, tales como, por ejemplo, la separación de las sales diastereoméricas formadas con aditivos ópticamente activos, *por ejemplo*, ácidos o bases, seguido de la conversión de nuevo a las sustancias ópticamente activas. En la mayoría de los casos, el isómero óptico deseado se sintetiza por medio de reacciones estereoespecíficas, comenzando con el estereoisómero apropiado del material de partida deseado o a través de reacciones enantioselectivas.

Los compuestos de la divulgación también pueden existir como isómeros tautoméricos en determinados casos. Aunque solo puede representarse un tautómero, todas estas formas están contempladas dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, pueden existir tautómeros de ene-amina para purina, pirimidina, imidazol, guanidina, amidina y sistemas de tetrazol, y todas sus posibles formas tautoméricas están dentro del alcance de la divulgación.

Sales e Hidratos

Los ejemplos de sales fisiológica o farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación incluyen sales procedentes de una base apropiada, tal como, por ejemplo, un metal alcalino (por ejemplo, sodio), un metal alcalino térreo (por ejemplo, magnesio), amonio y NX_4^+ (en la que X es alquilo C_1-C_4). Las sales fisiológicamente aceptables de un átomo de hidrógeno o un grupo amino incluyen sales de ácidos carboxílicos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos acético, benzoico, láctico, fumárico, tartárico, maleico, malónico, málico, isetiónico, lactobiónico y succínico; ácidos sulfónicos orgánicos, tal como, por ejemplo, ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico y p-toluenosulfónico; y ácidos inorgánicos, tal como, por ejemplo, ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y sulfámico. Las sales fisiológicamente aceptables de un compuesto de un grupo hidroxil incluyen el anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como, por ejemplo, Na^+ y NX_4^+ (en la que X se selecciona independientemente entre H o un grupo alquilo C_1-C_4).

Para uso terapéutico, las sales de ingredientes activos de los compuestos de la descripción serán normalmente fisiológicamente aceptables, *es decir* serán sales obtenidas a partir de un ácido o base fisiológicamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos o bases que no sean fisiológicamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente aceptable. Todas las sales, se obtengan o no de un ácido o base fisiológicamente aceptable, están dentro del alcance de la presente divulgación.

Las sales de metales se preparan normalmente haciendo reaccionar el hidróxido metálico con un compuesto de la presente divulgación. Los ejemplos de sales metálicas que se preparan de este modo son sales que contienen Li^+ , Na^+ y K^+ . Puede precipitarse una sal metálica menos soluble de la solución de una sal más soluble mediante la adición del compuesto metálico adecuado.

Además, pueden formarse sales a partir de la adición de ácido de determinados ácidos orgánicos e inorgánicos, *por ejemplo*, HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄ o ácidos sulfónicos orgánicos, a centros básicos, normalmente aminas, o a grupos ácidos. Finalmente, debe entenderse que las composiciones de la presente memoria comprenden compuestos de la divulgación invención en su forma no ionizada, así como la forma zwitteriónica, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua como en hidratos.

También se incluyen dentro del ámbito de esta divulgación las sales de los compuestos parentales con uno o más aminoácidos. Cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales son adecuados, especialmente los aminoácidos de origen natural hallados como componentes de las proteínas, aunque el aminoácido es normalmente uno que porte una cadena lateral con un grupo básico o ácido, *por ejemplo*, lisina, arginina o ácido glutámico, o un grupo neutral tal como, *por ejemplo*, glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina o leucina.

Métodos de inhibición de HCV

En este documento se describen métodos de inhibición de la actividad de HCV, que comprenden la etapa de tratar una muestra sospechosa de contener HCV con un compuesto o composición de la divulgación.

La etapa de tratamiento comprende añadir el compuesto de la divulgación a la muestra o comprende añadir un precursor de la composición a la muestra. La etapa de adición comprende cualquier método de administración como se describe anteriormente.

Si se desea, la actividad del HCV después de la aplicación del compuesto puede observarse por cualquier método, incluyendo métodos directos e indirectos de detección de la actividad del HCV. Están previstos todos los métodos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos de determinación de la actividad del HCV. Normalmente, se aplica uno de los métodos de exploración descritos anteriormente, sin embargo, cualquier otro método tal como, *por ejemplo*, la observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo, también es aplicable.

Muchos organismos contienen el HCV. Los compuestos de esta divulgación son útiles en el tratamiento o profilaxis de afecciones asociadas con activación del HCV en animales o en seres humanos.

Sin embargo, al explorar compuestos capaces de inhibir la actividad de HCV se debe tener en cuenta que los resultados de los ensayos enzimáticos puede que no siempre se correlacionen con los ensayos de cultivo celular. De este modo, un ensayo basado en células normalmente debe ser la herramienta principal de exploración.

Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos de esta divulgación se formulan con portadores y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica habitual. Los comprimidos contendrán excipientes, emolientes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril, y cuando están destinadas para su administración por otra administración que no sea la oral, generalmente serán isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes, tales como, *por ejemplo*, las mostradas en el Handbook of Pharmaceutical Excipients (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes, tales como, *por ejemplo*, EDTA, carbohidratos, tales como, *por ejemplo*, dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones oscila desde alrededor de 3 hasta alrededor de 11, pero habitualmente es de alrededor de 7 a 10. Normalmente, el compuesto se administrará en una dosis de 0,01 miligramos a 2 gramos. En una realización, la dosis será de aproximadamente 10 miligramos a 450 miligramos. Se contempla que el compuesto puede administrarse una vez, dos veces o tres veces al día.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante aproximadamente 12 semanas o menos. En realizaciones adicionales, el compuesto se administra durante aproximadamente 12 semanas o menos, aproximadamente 8 semanas o menos, aproximadamente 8 semanas o menos, aproximadamente 6 semanas o menos, o aproximadamente 4 semanas o menos. El compuesto puede administrarse una vez al día, dos veces al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana.

En realizaciones adicionales, se logra una respuesta virológica sostenida a aproximadamente 12 semanas, a aproximadamente 8 semanas, a aproximadamente 6 semanas, o a aproximadamente 4 semanas, o a aproximadamente 4 meses, o a aproximadamente 5 meses, o a aproximadamente 6 meses, o a aproximadamente 1 año, o a aproximadamente 2 años.

Aunque es posible que los principios activos se administren solos, puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, para su uso tanto humano como veterinario, de la divulgación comprenden al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más portadores aceptables y por lo tanto, opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores tiene/n que ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el receptor de los mismos.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las rutas de administración precedentes. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia farmacéutica. Las técnicas y formulaciones se encuentran en general en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el portador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. Por lo general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, en caso necesario, moldeando el producto.

Las formulaciones de la presente divulgación, adecuadas para administración oral, pueden presentarse como unidades discretas tales como, por ejemplo, cápsulas, obleas o comprimidos, que contienen cada uno de ellos una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede administrarse como un bolo, un electuario o una pasta.

Un comprimido se fabrica mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el principio activo en una forma suelta, tal como, por ejemplo, polvo o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden revestirse o marcarse y, de forma opcional, se formulan de forma que se proporcione una liberación lenta o controlada del principio activo de estos.

Para la administración al ojo u otros tejidos externos, *por ejemplo*, boca y piel, las formulaciones se aplican preferentemente como pomada o crema tópica que contiene el o los principios activos en una cantidad de, por ejemplo, del 0,075 al 20 % p/p (que incluyen el o los principios activos) en un intervalo entre el 0,1 % y el 20 % en incrementos de 0,1 % p/p, tales como, por ejemplo, 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), preferentemente del 0,2 al 15 % p/p y lo más preferentemente del 0,5 al 10 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los principios activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, los principios activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua.

Si se desea, la fase acuosa de la base de la 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, tales como, por ejemplo, propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de manera deseable un compuesto que potencia la absorción o la penetración del principio activo a través de la piel o de otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración cutánea incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

La fase oleosa de las emulsiones de la presente divulgación puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida, Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (conocido también como emulgente), comprende de forma deseable una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con tanto una grasa como un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulsionante o emulsionantes con o sin el estabilizador o estabilizadores constituyen la denominada cera emulsionante y la cera junto con el aceite y la grasa forman la denominada base de ungüento emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema.

Los emulgentes y estabilizantes de la emulsión para su uso en la formulación de la divulgación incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol de cetostearilo, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas. La crema debería ser preferentemente un producto no graso, que no manche y lavable, con la consistencia adecuada para evitar la filtración desde tubos u otros contenedores. Pueden usarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, alquilésteres mono o dibásicos, tales como, por ejemplo, di-isoadipato, estearato de isocetilo, propilenglicol diéster 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 preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, lípidos de alto punto de fusión, tales como, por ejemplo, parafina blanca blanda y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción comprenden uno o más compuestos de la descripción junto con uno o más portadores 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 de administración planeado. Cuando se usan para uso oral, por ejemplo, pueden prepararse comprimidos, troscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral

pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa. Son aceptables los comprimidos que contienen el principio activo mezclado con excipiente atóxico farmacéuticamente aceptable, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tal como, por ejemplo, carbonato cálcico o sódico, lactosa, lactosa monohidrato, croscarmelosa sódica, povidona, fosfato cálcico o sódico; agentes granulantes y disgregantes, tal como, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tal como, por ejemplo, celulosa, celulosa microcristalina, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas que incluyen la microencapsulación para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta forma una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material con retraso de tiempo, tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura, donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, fosfato cálcico o caolina, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas de la divulgación contienen el material activo en premezcla con los excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como, por ejemplo, un fosfátido 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, heptadecaetilenoicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol anhidro (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano). La suspensión acuosa también pueden contener uno o más conservantes, tales como, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tal como, por ejemplo, sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo al principio activo en un aceite vegetal, tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como, por ejemplo, parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes, tal como, por ejemplo, los mostrados anteriormente y agentes saborizantes para proporcionar una preparación oral más sabrosa. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como, por ejemplo, ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables de la divulgación, adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión se ilustran mediante los desvelados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como, por ejemplo, parafina líquida o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas presentes de forma natural, tal como, por ejemplo, goma arábiga y goma de tragacanto, fosfátidas de origen natural, tal como, por ejemplo, lecitina de haba de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tal como, por ejemplo, monooleato de sorbitano y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tal como, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y saborizantes. Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, tal como, por ejemplo, glicerol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un agente conservante, saborizante o colorante.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, tal como, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol o prepararse como polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, pueden emplearse de manera convencional aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse igualmente, por ejemplo, ácidos grasos, tales como, ácido oleico, en la preparación de inyectables.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material de portador para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación de liberación temporal prevista para la administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente 1 a 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad adecuada y conveniente de material de portador que puede variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 95 % de las composiciones totales (peso:peso). La composición farmacéutica puede prepararse para proporcionar cantidades fácilmente medibles para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa prevista para la infusión intravenosa puede contener desde aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de solución a fin de que se pueda producir la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

Las formulaciones adecuadas para administración sobre el ojo, incluyen gotas oculares, en las que el principio activo se disuelve o suspende en un portador adecuado, en especial un disolvente acuoso para el principio activo. El principio activo está presente preferentemente en dichas formulaciones en una concentración de 0,5 a 20 % p/p, ventajosamente del 0,5 al 10 %, particularmente aproximadamente el 1,5 % p/p.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden al principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como, por ejemplo, gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como 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 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500 micrómetros en incrementos de micrómetros, tales como, por ejemplo, 0,5, 1,30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administra por inhalación rápida a través del conducto nasal o mediante inhalación a través de la boca, de forma que alcance los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo. Las formulaciones adecuadas para la administración de aerosol o de polvo seco pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, Compuestos hasta ahora utilizados en el tratamiento o profilaxis de afecciones asociadas con la actividad de HCV.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen, además del principio activo, los portadores que en la técnica se sabe que son apropiados.

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

Las formulaciones se presentan en envases de dosis individual o de multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) que requiere únicamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se preparan a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones en dosis individual preferidas son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria, como se cita en el presente documento anteriormente, o una fracción apropiada de las misma, del principio activo.

Debe entenderse que además de los ingredientes mencionados concretamente con anterioridad, las formulaciones de esta divulgación pueden incluir otros agentes que, en la técnica, se relacionan convencionalmente con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

La divulgación proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo como se ha definido anteriormente junto con un portador, debido a ello.

Los portadores veterinarios son materiales útiles para el fin de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que, por otra parte, son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía oral, parenteral o mediante cualquier otra vía deseada.

Los compuestos de la divulgación también pueden formularse para proporcionar una liberación controlada del principio activo para permitir una dosificación menos frecuente o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad del principio activo. En consecuencia, la divulgación también proporciona composiciones que comprenden uno o más compuestos de la descripción formulada para liberación sostenida o controlada.

La dosis eficaz de un principio activo depende al menos de la naturaleza de la afección que se está tratando, la toxicidad, de si los compuestos están o no usándose de forma profiláctica (dosis menores), el método de administración y la formulación farmacéutica, y será determinado por el clínico usando estudios convencionales de escalado de dosis.

5

Vías de administración

Se puede administrar uno o más compuestos de la divulgación (mencionados en este documento como ingredientes activos) por cualquier vía apropiada para la afección a tratar. Las vías adecuadas incluyen la oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y similares. Se apreciará que la vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con la afección del destinatario. Una ventaja de los compuestos de esta divulgación es que están biodisponibles por vía oral y se pueden dosificar por vía oral.

10

15 Terapia de combinación contra el HCV

En otra realización, los ejemplos no limitantes de combinaciones adecuadas incluyen combinaciones de uno o más compuestos de la invención con uno o más interferones, ribavirina o sus análogos, inhibidores de la proteasa NS3 de HCV, inhibidores de la alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, inhibidores nucleosídicos o nucleotídicos de la polimerasa NS5B de HCV, inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B de HCV, inhibidores de NS5A de HCV, agonistas de TLR-7, inhibidores de ciclofilina, inhibidores de IRES de HCV, potenciadores de la farmacocinética y otros fármacos o agentes terapéuticos para tratar el HCV.

20

Más específicamente, se puede combinar uno o más compuestos de la invención con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en

25

1) interferones, por ejemplo, rIFN-alfa 2b pegilado (PEG-Intron®), rIFN-alfa 2a pegilado (Pegasys®), rIFN-alfa 2b (Intron® A), rIFN-alfa 2a (Roferon®-A), interferón alfa (MOR-22, OPC-18, Alfaferone®, Alfanative®, Multiferon®, subalina), interferón alfacon-1 (Infergen®), interferón alfa-n1 (Wellferon), interferón alfa-n3 (Alferon®), interferón beta (Avonex®, DL-8234), interferón-omega (omega DUROS®, Biomed® 510), albinterferón alfa-2b (Albuzferon®), IFN alfa-2b XL, BLX-883 (Locteron®), DA-3021, interferón alfa-2b glucosilado (AVI-005), PEG-Infergen, interferón lambda-1 PEGilado (IL-29 PEGilada) y Belerofon®;

30

2) ribavirina y sus análogos, por ejemplo, ribavirina (Rebetol®, Copegus®) y taribavirina (Viramidine®);

35

3) inhibidores de la proteasa NS3 de HCV, por ejemplo, boceprevir (SCH-503034, SCH-7), telaprevir (VX-950), TMC435350, BI-1335, BI-1230, MK-7009, VBY-376, VX-500, GS-9256, GS-9451, BMS-605339, PHX-1766, AS-101, YH-5258, YH5530, YH5531, ABT-450, ACH-1625, ITMN-191, AT26893, MK5172, MK6325 y MK2748;

40

4) inhibidores de la alfa-glucosidasa 1, por ejemplo, celgosivir (MX-3253), Miglitol y UT-231B;

5) hepatoprotectores, por ejemplo, emericasan (IDN-6556), ME-3738, GS-9450 (LB-84451), silibilina y MitoQ;

45

6) inhibidores nucleosídicos o nucleotídicos de la polimerasa NS5B de HCV, por ejemplo, R1626, R7128 (R4048), IDX184, IDX-102, BCX-4678, valopicitabina (NM-283), MK-0608, sofosbuvir (GS-7977 (antiguamente PSI-7977)), VLX-135 (antiguamente ALS-2200) y INX-189 (ahora BMS986094);

50

7) inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B de HCV, por ejemplo, PF-868554, VCH-759, VCH-916, JTK-652, MK-3281, GS-9190, VBY-708, VCH-222, A848837, ANA-598, GL60667, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, VCH-796 (nesbuvir), GSK625433, BILN-1941, XTL-2125, ABT-072, ABT-333, GS-9669, PSI-7792 y GS-9190;

55

8) inhibidores de NS5A de HCV, por ejemplo, AZD-2836 (A-831), BMS-790052, ACH-3102, ACH-2928, MK8325, MK4882, MK8742, PSI-461, IDX719, GS-5885 y A-689;

9) agonistas de TLR-7, por ejemplo, imiquimod, 852A, GS-9524, ANA-773, ANA-975 (isatoribina), AZD-8848 (DSP-3025) y SM-360320;

60

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

11) inhibidores de IRES de HCV, por ejemplo, MCI-067;

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

65

13) otros fármacos para tratar el HCV, por ejemplo, timosina alfa 1 (Zadaxin), nitazoxanida (Alinea, NTZ), BIVN-

401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilon (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 y VX-497 (merimepodib).

5 En otra realización más, la presente solicitud describe composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como se describe en este documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un agente terapéutico adicional y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y sofosbuvir y/o GS-5885 y opcionalmente un interferón o ribavirina.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un inhibidor nucleosídico o nucleotídico de la polimerasa NS5B de HCV y opcionalmente un interferón o ribavirina.

15 Se contempla que se administrarán agentes terapéuticos adicionales de una manera que es conocida en la técnica y que la dosificación puede seleccionarse por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden administrar agentes terapéuticos adicionales en una dosis de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 2 gramos al día.

20 **Metabolitos de los compuestos**

Los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos pueden producirse, por ejemplo, por la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. Dichos productos normalmente se identifican preparando un compuesto radiomarcado (por ejemplo, C¹⁴ o H³) de la divulgación, administrándolo por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo, mayor de 25 aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como, por ejemplo, rata, ratón, cobaya, mono o a un ser humano, dejando tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (normalmente de aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, la sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan con facilidad ya que están marcados (otros se aíslan por el uso de anticuerpos capaces de unirse a 30 epítomos, que sobreviven en el metabolito). Las estructuras del metabolito se determinan de forma convencional, por ejemplo, por análisis de EM o RMN. En general, el análisis de los metabolitos se realiza de la misma forma que en los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos para los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren de otra forma *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de la divulgación, incluso si no tienen actividad inhibitoria de HCV por sí mismos.

35 Se conocen métodos para determinar la estabilidad de los compuestos en secreciones gastrointestinales equivalentes.

40 **Métodos a modo de ejemplo de preparación de los compuestos**

Las composiciones se preparan por cualquiera de las técnicas aplicables de síntesis orgánica. Muchas de dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. Sin embargo, muchas de las técnicas conocidas están detalladas en Compendium of Organic Synthetic Methods (John Wiley & Sons, Nueva York), Vol. 1, Ian T. Harrison y Shuyen Garrison, 1971; Vol. 2, Ian T. Harrison y Shuyen Harrison, 1974; Vol. 3, Louis S. Hegedus y Leroy Wade, 1977; Vol. 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; Vol. 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; y Vol. 6, Michael B. Smith; así como March, J., Advanced Organic Chemistry, tercera edición, (John Wiley & Sons, Nueva York, 1985), Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. En 9 volúmenes, Barry M. Trost, director de redacción (Pergamon Press, Nueva York, impresión de 1993). Otros métodos adecuados para preparar los 45 compuestos de la divulgación se describen en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 2006/020276.

Se proporcionan varios métodos a modo de ejemplo para la preparación de las composiciones de la divulgación en los esquemas y los ejemplos a continuación. Estos métodos pretenden ilustrar la naturaleza de dichas preparaciones y no pretenden limitar el alcance de los métodos aplicables.

55 En general, las condiciones de reacción, tales como, por ejemplo, la temperatura, el tiempo de reacción, los disolventes, los procedimientos de pretratamiento y similares, serán los habituales en la técnica para la reacción particular a realizar. El material de referencia citado, junto con el material citado en el mismo, contiene descripciones detalladas de dichas condiciones. Normalmente las temperaturas serán de -100 °C a 200 °C, los disolventes serán 60 apróticos o próticos y los tiempos de reacción serán de 10 segundos a 10 días. El pretratamiento normalmente consiste en inactivar cualquier reactivo sin reaccionar seguido de reparto entre un sistema de capa acuosa/orgánica (extracción) y separar la capa que contiene el producto.

Las reacciones de oxidación y reducción se llevan a cabo normalmente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), aunque para reducciones de hidruros metálicos con frecuencia la temperatura se reduce a 0 °C a -100 °C, los disolventes son normalmente apróticos para las reducciones y pueden ser próticos o

apróticos para las oxidaciones. Los tiempos de reacción se ajustan para conseguir las conversiones deseadas.

Las reacciones de condensación se llevan a cabo normalmente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, aunque para no equilibrar, las condensaciones controladas cinéticamente también son comunes a temperaturas reducidas (0 °C a -100 °C). Los disolventes pueden ser próticos (comunes en reacciones de equilibrio) o apróticos (comunes en reacciones cinéticamente controladas).

Las técnicas sintéticas estándar tales como, por ejemplo, la retirada azeotrópica de subproductos de reacción y el uso de condiciones de reacción anhidras (por ejemplo, entornos de gas inerte) son comunes en la técnica y se aplicarán cuando sea aplicable.

Los términos "tratado", "tratando", "tratamiento", y similares, cuando se usa en conexión con una operación sintética química, significa poner en contacto, mezclar, reaccionar, permitir reaccionar, poner en contacto, y otros términos comunes en la técnica para indicar que una o más entidades químicas son tratadas de tal manera que se convierten a una o más de otras entidades químicas. Esto significa que "tratar el compuesto uno con el compuesto dos" es sinónimo de "permitir que el compuesto uno reaccione con el compuesto dos", "poner en contacto el compuesto uno con el compuesto dos", "hacer reaccionar el compuesto uno con el compuesto dos", y otras expresiones comunes en la técnica de síntesis orgánica para indicar razonablemente que el compuesto uno fue "tratado", "se hizo reaccionar", "se dejó reaccionar", etc., con el compuesto dos. Por ejemplo, el tratamiento indica la manera razonable y usual en la que se permite que los compuestos químicos orgánicos reaccionen. Las concentraciones normales (de 0,01 M a 10 M, normalmente 0,1 M a 1 M), las temperaturas (-100 °C a 250 °C, normalmente de -78 °C a 150 °C, más normalmente de -78 °C a 100 °C, todavía más normalmente de 0 °C a 100 °C), los recipientes de reacción (normalmente vidrio, plástico, metal), disolventes, presiones, atmósferas (normalmente aire para reacciones de oxígeno e insensibles al agua o nitrógeno o argón para oxígeno o sensibles al agua), etc. a menos que se indique lo contrario. El conocimiento de reacciones similares conocidas en la técnica de síntesis orgánica se usa para seleccionar las condiciones y el aparato para "tratar" en un proceso dado. En particular, un experto en la materia de síntesis orgánica selecciona las condiciones y el aparato razonablemente esperados para llevar a cabo con éxito las reacciones químicas de los procedimientos descritos basándose en el conocimiento en la técnica.

Las modificaciones de cada uno de los esquemas a modo de ejemplo y en los Ejemplos (en lo sucesivo "esquemas a modo de ejemplo") conducen a producir diversos análogos de los materiales a modo de ejemplo específicos. Las citaciones citadas anteriormente que describen métodos adecuados de síntesis orgánica son aplicables a tales modificaciones.

En cada uno de los esquemas a modo de ejemplo puede ser ventajoso separar productos de reacción unos de otros y/o de los materiales de partida. Los productos deseados de cada etapa o serie de etapas se separan y/o purifican (en lo sucesivo separan) al grado deseado de homogeneidad mediante las técnicas comunes en la materia. Normalmente, tales separaciones implican extracción multifase, cristalización en un disolvente o mezcla de disolventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede implicar diversos métodos incluyendo, por ejemplo: fase inversa o fase normal; exclusión por tamaño; intercambio iónico; aparatos y métodos de cromatografía líquida de alta, media y baja presión; analítica a pequeña escala; lecho de movimiento simulado (SMB) y cromatografía preparativa de capa fina o espesa, así como técnicas de cromatografía de capa fina y ultrarrápida a pequeña escala.

Otras clase de métodos de preparación implican el tratamiento de una mezcla con un reactivo seleccionado para unirse a, o producir de otro modo, un producto deseado separable, material de partida sin reaccionar, reacción por producto o similares. Tales reactivos incluyen adsorbentes o absorbentes, tales como, por ejemplo, carbono activado, tamices moleculares, medios de intercambio iónico o similares. Como alternativa, los reactivos pueden ser ácidos en el caso de un material básico, bases en el caso de un material ácido, reactivos de unión, tales como, por ejemplo, anticuerpos, proteínas de unión, quelantes selectivos, tales como, por ejemplo, éteres de corona, reactivos de extracción iónica líquido/líquido (LIX) o similares.

La selección de los métodos de separación adecuados depende de la naturaleza de los materiales implicados. Por ejemplo, punto de ebullición y peso molecular en destilación y sublimación, presencia o ausencia de grupos funcionales polares en cromatografía, estabilidad de materiales en medios ácidos y básicos en extracción multifase y similares. Un experto en la materia aplicará técnicas con más posibilidades de lograr la separación deseada.

Un estereoisómero individual, *por ejemplo*, un enantiómero, sustancialmente libre de su estereoisómero puede obtenerse por resolución de la mezcla racémica usando un método, tal como, por ejemplo, formación de diastereómeros usando agentes de resolución ópticamente activos (Stereochemistry of Carbon Compounds, (1962) de E. L. Eliel, McGraw Hill; Lochmuller, C. H., (1975) J. Chromatogr., 113, 3) 283-302). Pueden separarse mezclas racémicas de compuestos quirales de la divulgación y aislarse por cualquier método adecuado, que incluye: (1) formación de sales diastereoméricas iónicas con compuestos quirales y separación por cristalización fraccionada u otros métodos, (2) formación de compuestos diastereoméricos con reactivos de derivatización quiral, separación de los diastereoisómeros y conversión a los estereoisómeros puros, y (3) separación de los estereoisómeros sustancialmente puros o enriquecidos directamente en condiciones quirales.

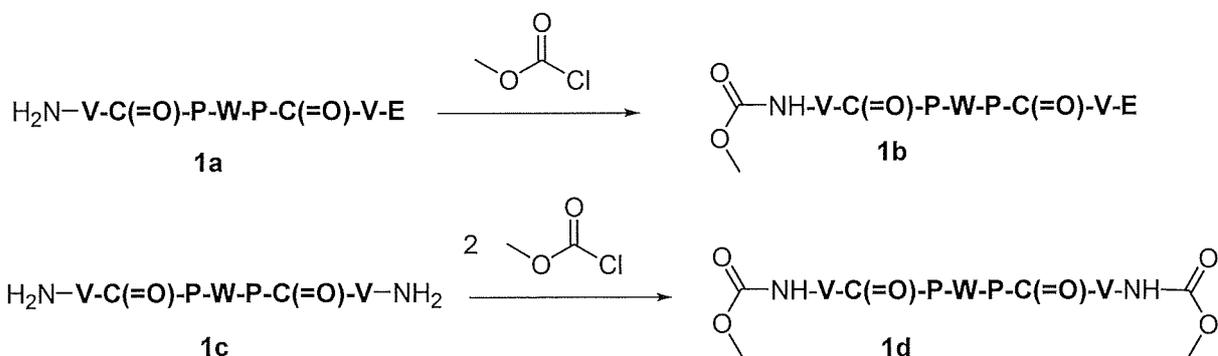
- Bajo el método (1), pueden formarse sales diastereoméricas por reacción de bases quirales enantioméricamente puras, tales como, por ejemplo, brucina, quinina, efedrina, estricnina, α -metil- β -feniletilamina (anfetamina) y similares, con compuestos asimétricos que portan funcionalidad ácida, tal como, por ejemplo, ácido carboxílico y ácido sulfónico. Puede inducirse la separación de las sales diastereoméricas por cristalización fraccionada o cromatografía iónica. Para la separación de los isómeros ópticos de compuestos amino, la adición de ácidos carboxílicos o sulfónicos quirales, tal como, por ejemplo, ácido alcanforsulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico o ácido láctico puede resultar en la formación de sales diastereoméricas.
- Como alternativa, por el método (2), el sustrato que debe resolverse se hace reaccionar con un enantiómero de un compuesto quiral para formar un par diastereomérico (Eliel, E. y Wilen, S. (1994) Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., pág. 322). Pueden formarse compuestos diastereoméricos haciendo reaccionar compuestos asimétricos con reactivos derivatizantes enantioméricamente puros, tal como, por ejemplo, derivados de metilo, seguido por la separación de los diastereómeros y la hidrólisis para producir el sustrato enantioméricamente enriquecido libre. Un método para determinar la pureza óptica implica hacer ésteres quirales, tal como, por ejemplo, un éster mentílico, *por ejemplo*, (-) cloroformiato de mentilo en presencia de una base éster de Mosher, acetato de α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilo (Jacob III. (1982) J. Org. Chem. 47:4165), de la mezcla racémica, y analizar el espectro de RMN para determinar la presencia de dos diastereómeros atropisoméricos. Pueden separarse y aislarse diastereómeros estables de compuestos atropisoméricos por cromatografía de fase normal y de fase inversa, siguiendo métodos para la separación de naftil-isoquinolinas atropisoméricas (Hoye, t., WO 96/15111). Por el método (3), una mezcla racémica de dos enantiómeros puede separarse por cromatografía usando una fase estacionaria quiral (Chiral Liquid Chromatography (1989) W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, Nueva York; Okamoto, (1990) J. of Chromatogr. 513:375-378). Pueden distinguirse enantiómeros enriquecidos o purificados por métodos usados para distinguir otras moléculas quirales con átomos de carbono asimétricos, tal como, por ejemplo, rotación óptica y dicroísmo circular.

Esquemas y Ejemplos

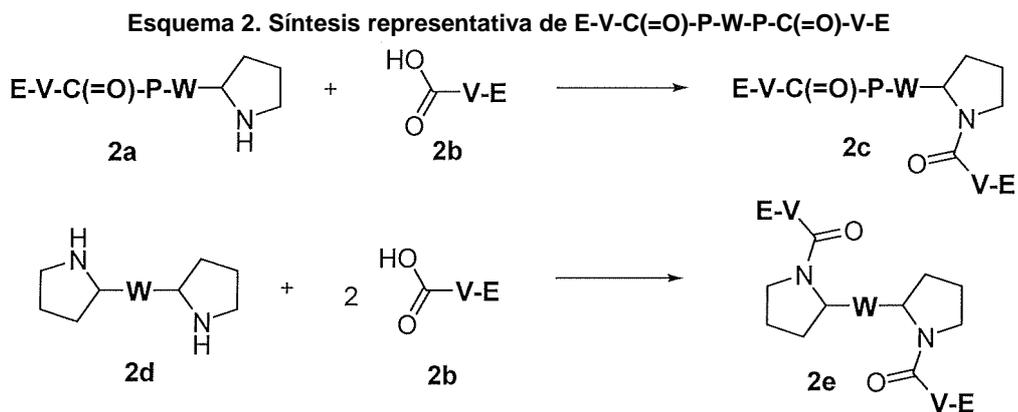
- Los aspectos generales de estos métodos a modo de ejemplo se describen a continuación y en los Ejemplos. Cada uno de los productos de los siguientes procesos está opcionalmente separado, aislado y/o purificado antes de su uso en procesos posteriores.

- Se proporcionan en el presente documento varios métodos a modo de ejemplo para la preparación de compuestos de la divulgación, por ejemplo, en los Ejemplos a continuación. Estos métodos pretenden ilustrar la naturaleza de tales preparaciones y no pretenden limitar el alcance de los métodos aplicables. Ciertos compuestos de la descripción se pueden usar como intermedios para la preparación de otros compuestos de la divulgación. En los métodos a modo de ejemplo descritos en el presente documento, el fragmento **E-V** también puede escribirse como **R9**. PG representa un grupo protector común para el grupo funcional dado al que está unido. La instalación y la retirada del grupo protector puede llevarse a cabo usando técnicas estándar, tales como, por ejemplo, las descritas en Wuts, P. G. M., Greene, T. Protective Groups in Organic Synthesis, 4^a ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, Nueva Jersey, 2007.

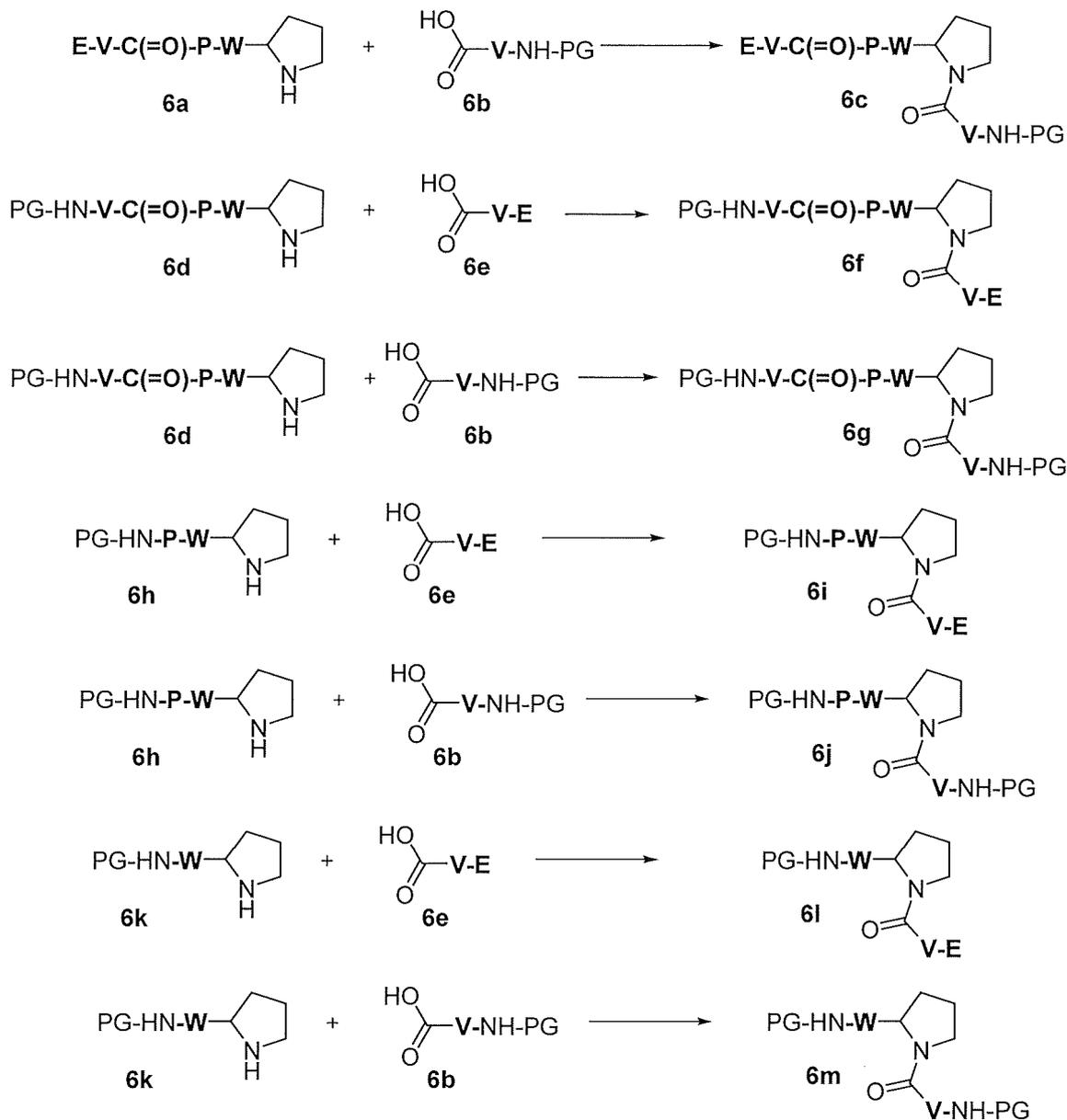
Esquema 1. Síntesis representativa de E-V-C(=O)-P-W-P-C(=O)-V-E



- El Esquema 1 muestra una síntesis general de una molécula E-V-C(=O)-P-W-P-C(=O)-V-E de la invención en la que, para los propósitos ilustrativos, E es metoxicarbonilamino. El tratamiento, ya sea el 1a o el 1c con uno o dos equivalentes respectivamente de cloroformiato de metilo en condiciones básicas (por ejemplo, hidróxido sódico) proporciona la molécula 1b o 1d.



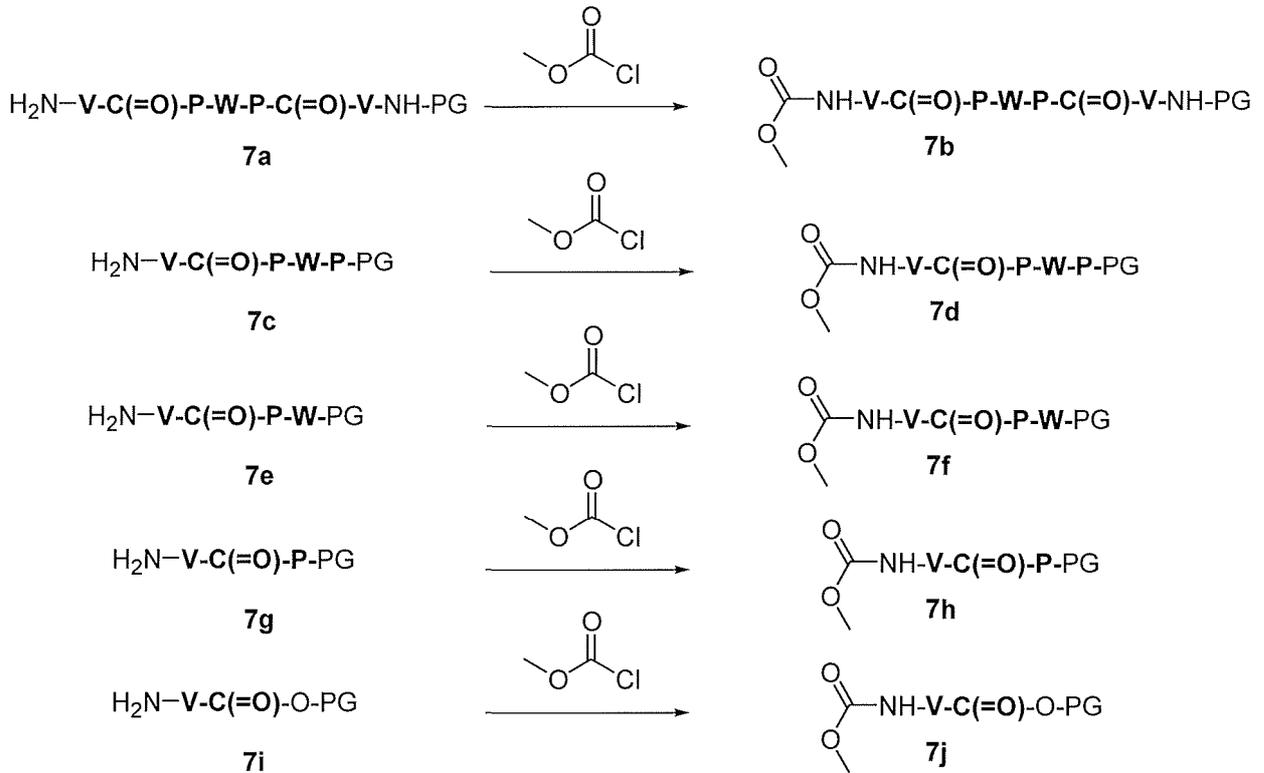
- 5 El Esquema 2 muestra una síntesis general de una molécula **E-V-C(=O)-P-W-P-C(=O)-V-E** de la invención en la que, para los propósitos ilustrativos, P es pirrolidina. El acoplamiento de la amina 2a con el ácido 2b se lleva a cabo utilizando un reactivo de acoplamiento peptídico (por ejemplo HATU) para proporcionar 2c. Como alternativa, la amina 2d se acopla con dos equivalentes de 2b en condiciones similares para proporcionar 2e.

Esquema 6. Síntesis representativa de $R^1\text{-V-C(=O)-P-R}^2$ 

- 5 El Esquema 6 muestra una síntesis general de un intermedio $R^1\text{-V-C(=O)-P-R}^2$ en el que, para los propósitos ilustrativos, **P** es pirrolidina, R^1 es un grupo genérico que se representa como E o un grupo protector de amino, y R^2 es un grupo genérico que se representa como $-\text{W-P-C(=O)-V-E}$, $-\text{W-P-C(=O)-V-NH-PG}$, $-\text{W-P-NH-PG}$ o $-\text{W-NH-PG}$. El acoplamiento de la amina **6a** (o **6d**, **6h**, **6k**) con el ácido **6b** o **6e** se consiguió usando un reactivo de acoplamiento de péptido (por ejemplo, HATU) para proporcionar **6c** (o **6f**, **6g**, **6i**, **6j**, **6l**, **6m**) respectivamente.

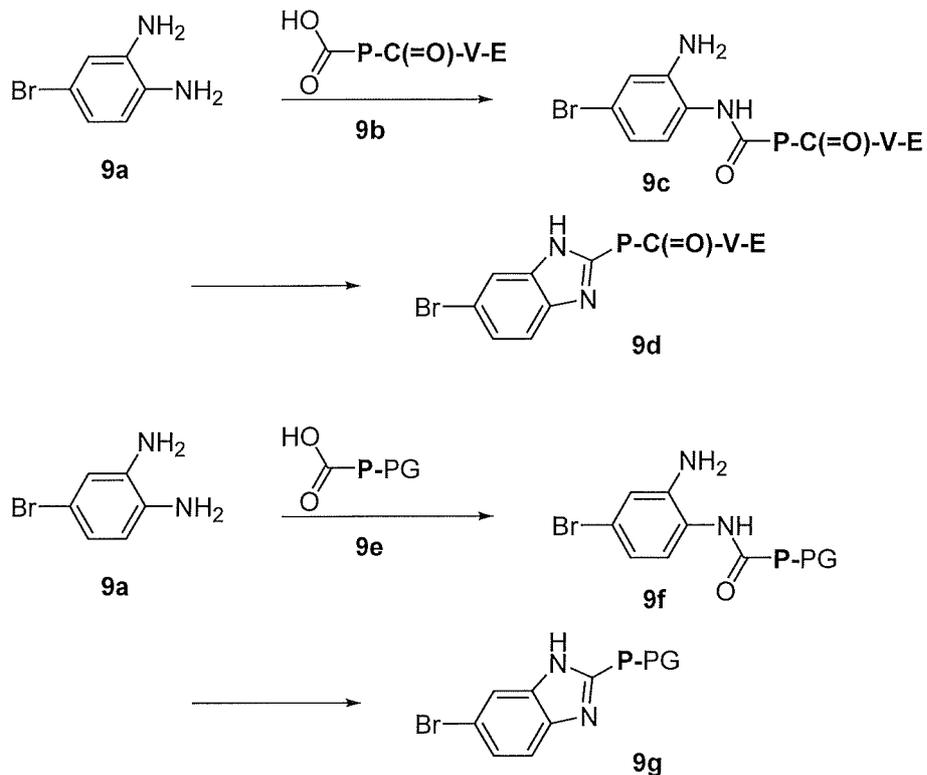
10

Esquema 7. Síntesis representativa de E-V-C(=O)-R¹



5 El Esquema 7 muestra una síntesis general de un intermedio E-V-C(=O)-R¹ en el que, para los propósitos ilustrativos, E es metoxicarbonilamino y R¹ es un grupo genérico que se representa como -P-W-P-C(=O)-V-NH-PG, -P-W-P-PG, -P-W-PG, -P-PG o -O-PG. El tratamiento de 7a (o 7c, 7e, 7g, 7i) con cloroformiato de metilo en condiciones básicas (por ejemplo, hidróxido sódico) proporciona la molécula 7b (o 7d, 7f, 7h, 7j).

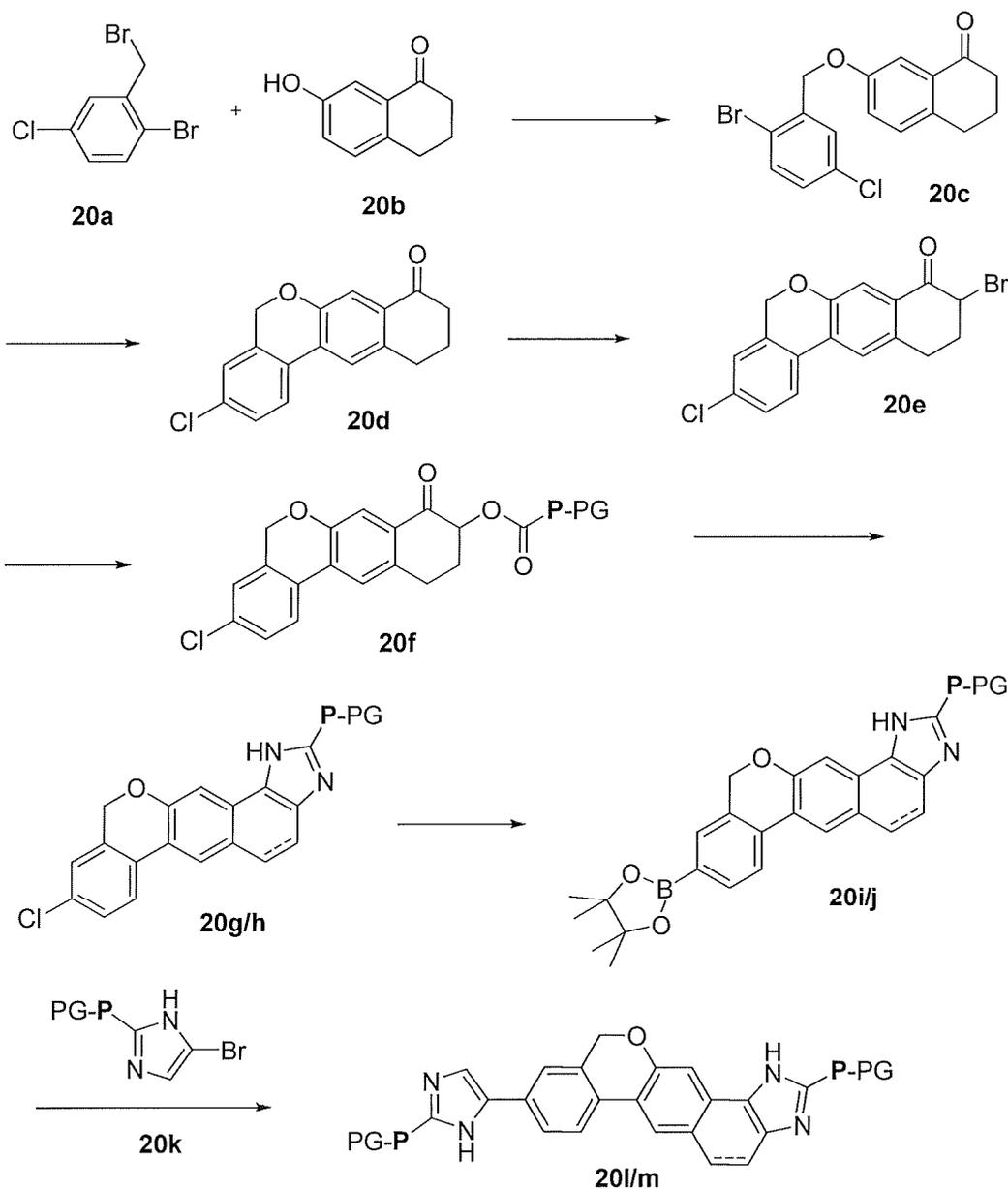
Esquema 9. Síntesis representativa de R¹-P-R²



El Esquema 9 muestra una síntesis general de un intermedio R^1 -P- R^2 en el que, para los propósitos ilustrativos, R^1 es -C(=O)-V-E o un grupo protector y R^2 es benzamidazol sustituido. La formación del benzoimidazol se consigue por acoplamiento del ácido **9b** o **9e** con una arilamina **9a**, usando un reactivo de acoplamiento de péptido, tal como HATU, para proporcionar **9c** o **9d**. La ciclación de la amida en presencia de un ácido (tal como ácido acético) proporciona la molécula que contiene bencimidazol **9d** o **9g**.

La formación de bencimidazoles múltiples se realiza de la misma manera, comenzando con una bis-diamina para proporcionar el correspondiente bis-benzamidazol.

10

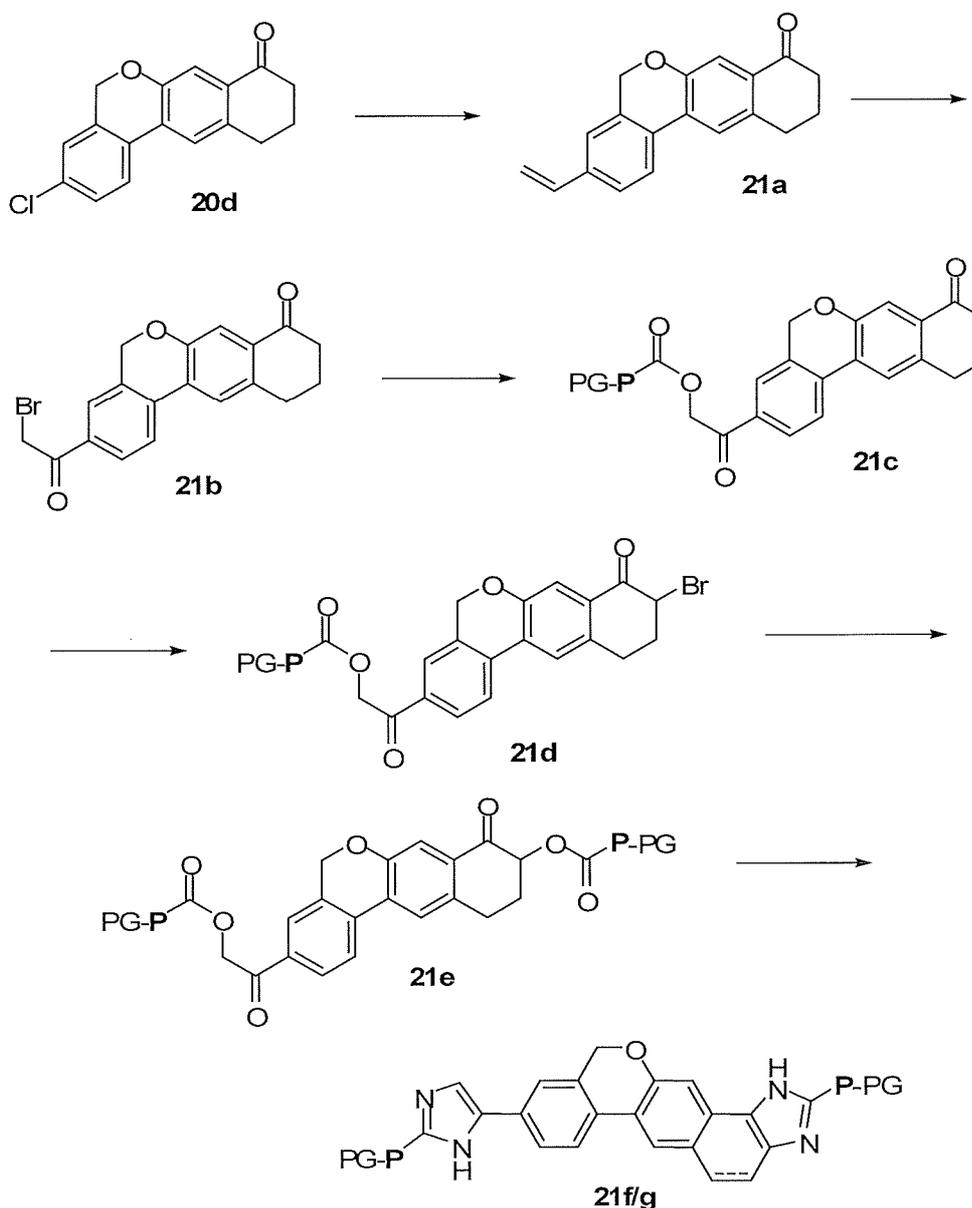
Esquema 17 Síntesis representativa de R^1 -P-W-P- R^2 

15

El Esquema 20 muestra una síntesis general de un intermedio R^1 -P-W-P- R^2 de la invención, en el que, para los propósitos ilustrativos, R^1 y R^2 son grupos protectores independientes y **W** es una unidad de dos anillos aromáticos construida mediante una ciclación mediada por un metal de transición. La alquilación de fenol **20b** con un bromuro de alquilo, tal como **20a**, proporciona el éter **20c**. La ciclación de los anillos aromáticos en presencia de un catalizador de paladio proporciona el compuesto **20d**. El tratamiento de **20d** con $CuBr_2$ proporciona la α -haloacetona **20e**, que proporciona **20f** tras la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, Et_3N). La reacción de **20f** con una amina o sal de amina (por ejemplo, acetato amónico) proporciona la molécula **20g** que contiene imidazol. La oxidación de **20g**, **20i**, o **20l** puede realizarse por el calentamiento en presencia de MnO_2 para proporcionar **20h**, **20j**, o **20m**, respectivamente. La conversión de **20g** o **20h** con un catalizador de paladio, tal como Pd_2dba_3 y X-Phos, y una fuente de boro, tal como bis(pinacolato)diboro proporciona el éster borónico

20

éster se acopla con un socio de acoplamiento apropiado (por ejemplo, **20k**) usando un catalizador de paladio, tal como Pd(PPh₃)₄ o PdCl₂(dppf), para proporcionar **20l** o **20m**. Para cada reacción de acoplamiento cruzado mediada por metal de transición, las funciones del nucleófilo y del electrófilo pueden invertirse para proporcionar el mismo producto de acoplamiento. Otros acoplamientos cruzados mediados por metales de transición que permiten la construcción de **W**, pero emplean acoplamientos y reactivos alternativos, incluyen, pero no se limitan a, los acoplamientos Negishi, Kumada, Stille y Ullman. Para la preparación de dos anillos aromáticos que contienen grupos **W**, este esquema general puede aplicarse mediante la elección apropiada de los reactivos de partida.

Esquema 18 Síntesis representativa de R¹-P-W-P-R²

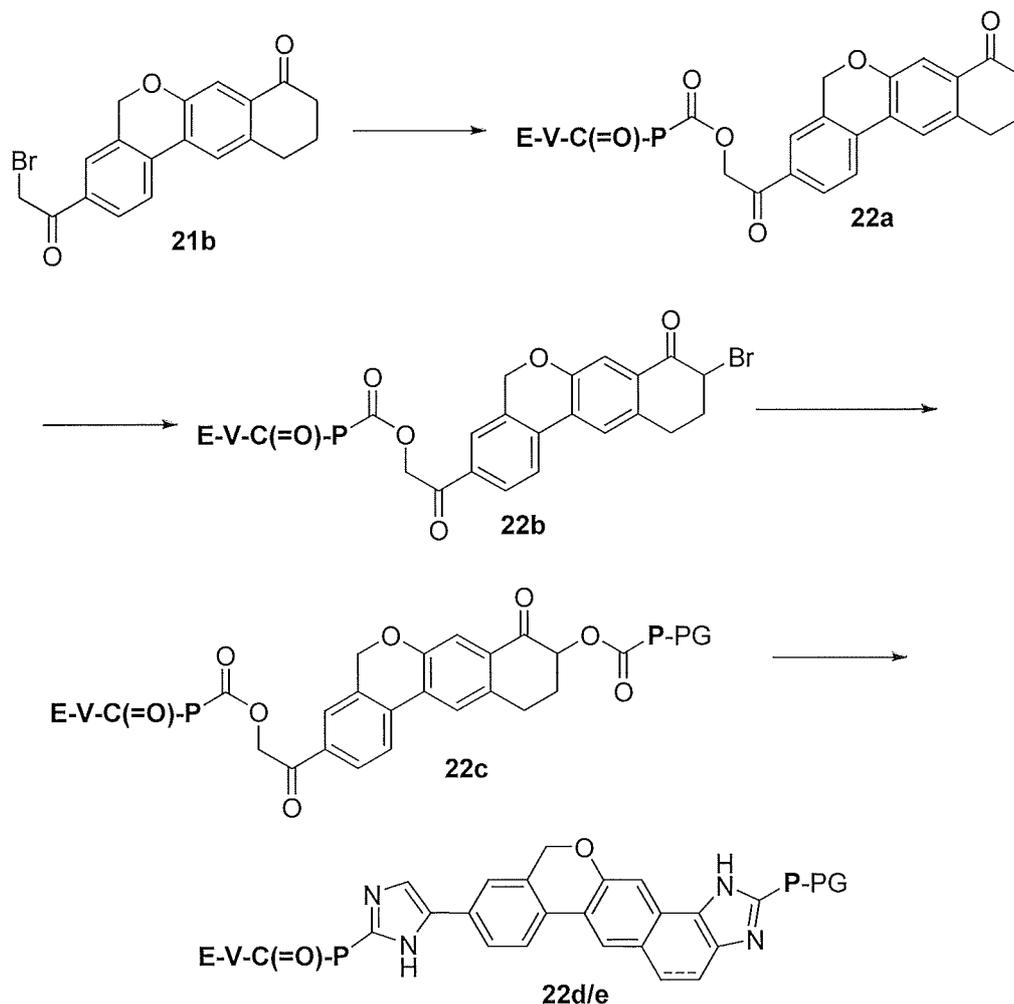
10

15

20

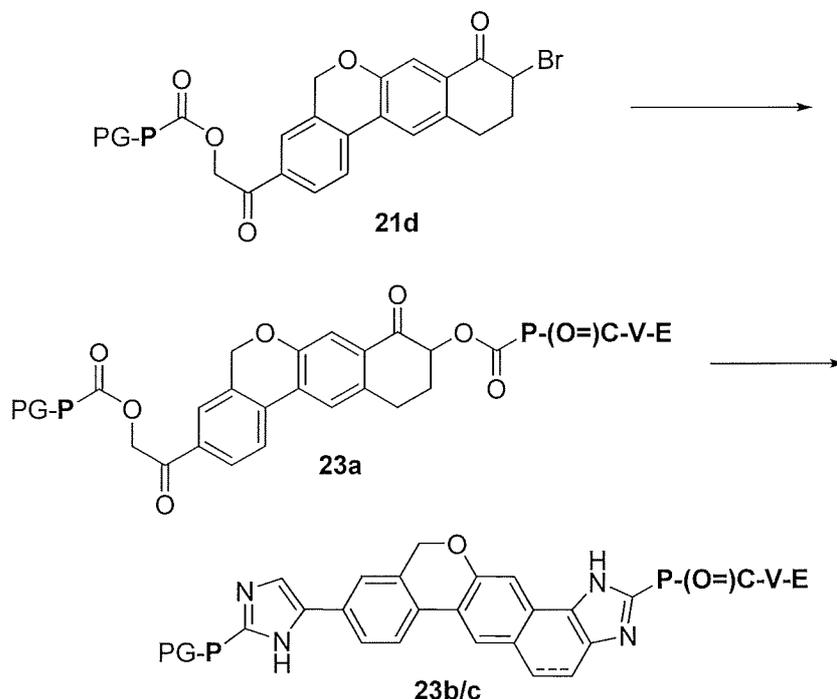
El Esquema 21 muestra una síntesis general de un intermediario $R^1\text{-P-W-P-R}^2$ de la invención, en el que, para los propósitos ilustrativos, R^1 y R^2 son grupos protectores independientes y **W** es una unidad de dos anillos aromáticos construida mediante una ciclación mediada por un metal de transición. El tratamiento de **20d** con un reactivo de vinilo activado (por ejemplo, trifluoroborato potásico) en presencia de un catalizador de paladio (por ejemplo, acetato de paladio y S-Phos) proporciona el compuesto vinílico **21a**. La conversión a la α -halo cetona correspondiente puede realizarse por bromación con N-bromosuccinimida, seguido de oxidación con MnO₂. El desplazamiento de la α -halo cetona se produce mediante la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, Et₃N). La bromación de **21d** prosigue tras el tratamiento con tribromuro de piridinio y se sigue la adición de un segundo ácido en condiciones básicas para proporcionar el diéster **21e**. La reacción de **21e** con una amina o sal de amina (por ejemplo, acetato amónico) proporciona la molécula **21f** que contiene imidazol. La oxidación de **21f** puede realizarse en presencia de MnO₂ para proporcionar **21g**.

Esquema 19 Síntesis representativa de E-V-C(=O)-P-W-P-R



- 5 El Esquema 22 muestra una síntesis general de un intermedio E-V-C(=O)-P-W-P-R de la invención en el que, para los propósitos ilustrativos, R es un grupo protector y W es una unidad de dos anillos aromáticos. El desplazamiento de la α -halo cetona **21b** se produce mediante la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, Et₃N). La bromación de **22b** prosigue tras el tratamiento con tribromuro de piridinio y se sigue la adición de un segundo ácido en condiciones básicas para proporcionar el diéster **22c**. La reacción de **22c** con una amina o sal de amina (por ejemplo, acetato amónico) proporciona la molécula **22d** que contiene imidazol. La oxidación de **22d** puede realizarse en presencia de MnO₂ para proporcionar **22e**.
- 10

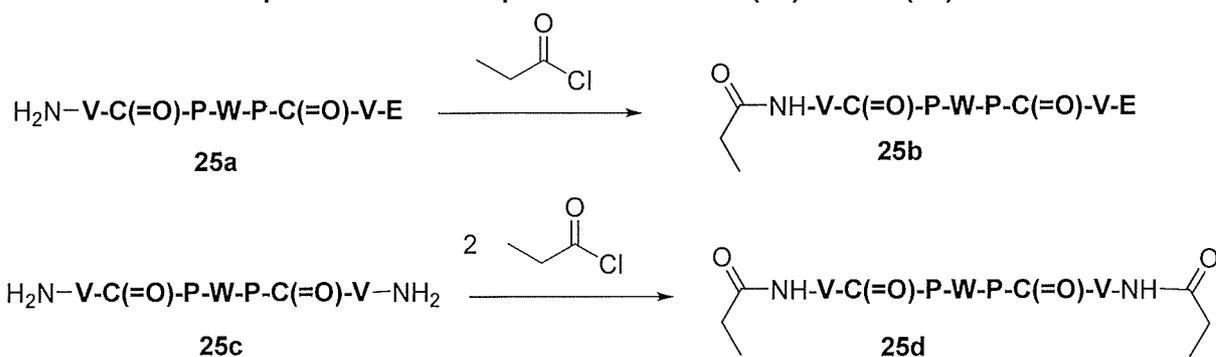
Esquema 20 Síntesis representativa de R-P-W-P-C(=O)-V-E



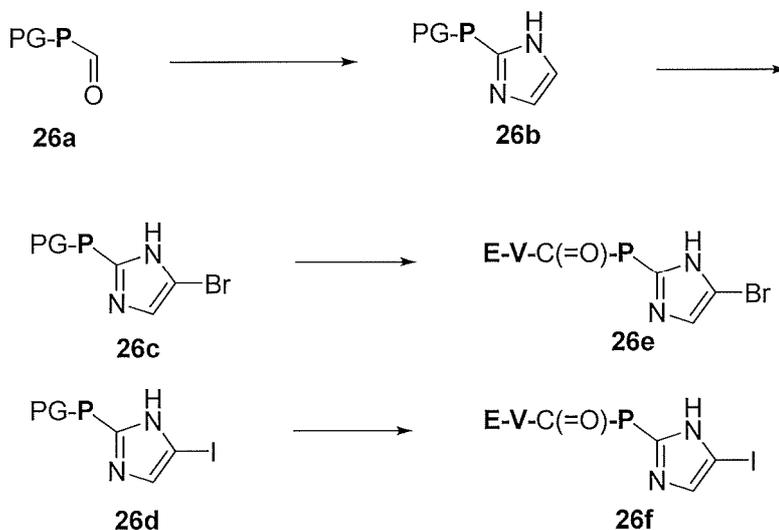
- 5 El Esquema 23 muestra una síntesis general de un intermedio **E-V-C(=O)-P-W-P-R** de la invención en el que, para los propósitos ilustrativos, **R** es un grupo protector y **W** es una unidad de dos anillos aromáticos. El desplazamiento de la α -halo cetona **21d** se produce mediante la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, Et_3N). La reacción de **23a** con una amina o sal de amina (por ejemplo, acetato amónico) proporciona la molécula **23b** que contiene imidazol. La oxidación de **23b** puede realizarse en presencia de MnO_2 para proporcionar **23c**.

10

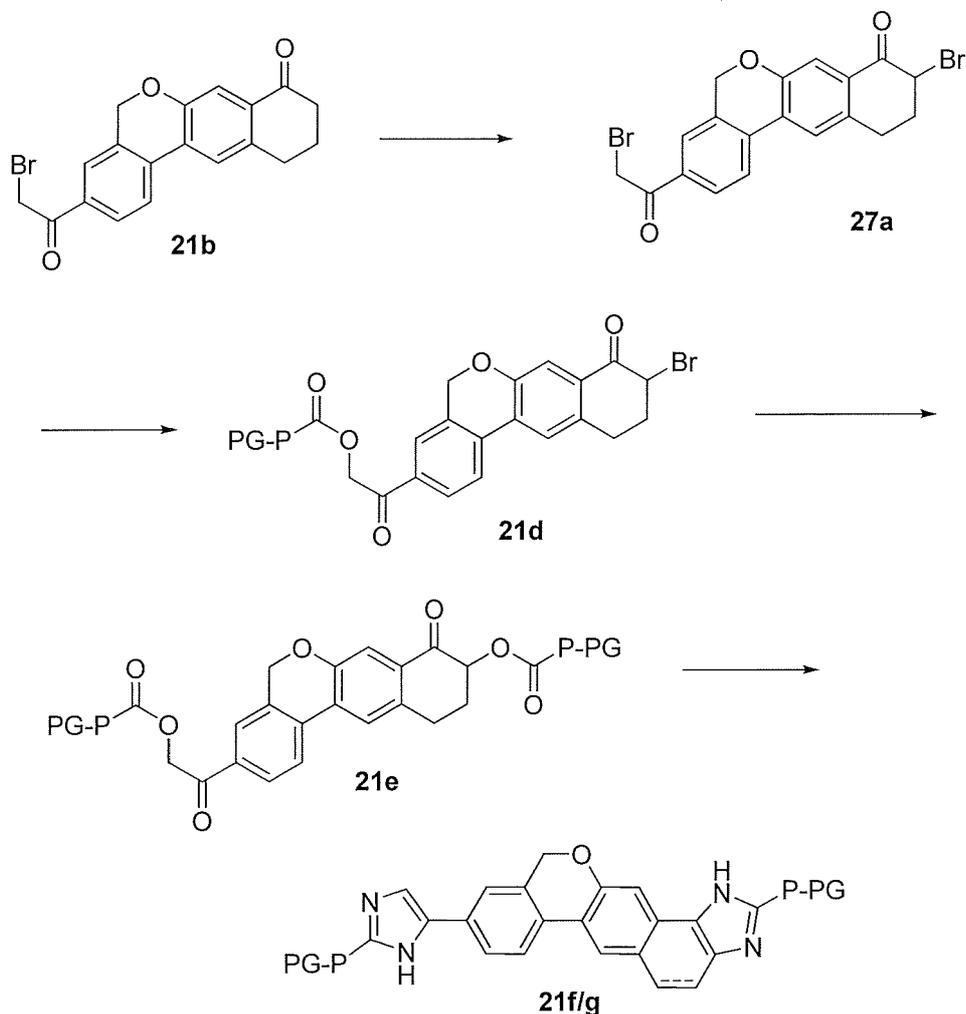
Esquema 25. Síntesis representativa de E-V-C(=O)-P-W-P-C(=O)-V-E



- 15 El Esquema 25 muestra una síntesis general de una molécula **E-V-C(=O)-P-W-P-C(=O)-V-E** de la invención en la que, para los propósitos ilustrativos, **E** es etilcarbonilamino. El tratamiento, ya sea el **25a** o el **25c** con uno o dos equivalentes respectivamente de cloruro de propionilo en condiciones básicas (por ejemplo, hidróxido sódico) proporciona la molécula **25b** o **25d**.

Esquema 21 Síntesis representativa de E-V-C(=O)-P-R y R¹-P-R

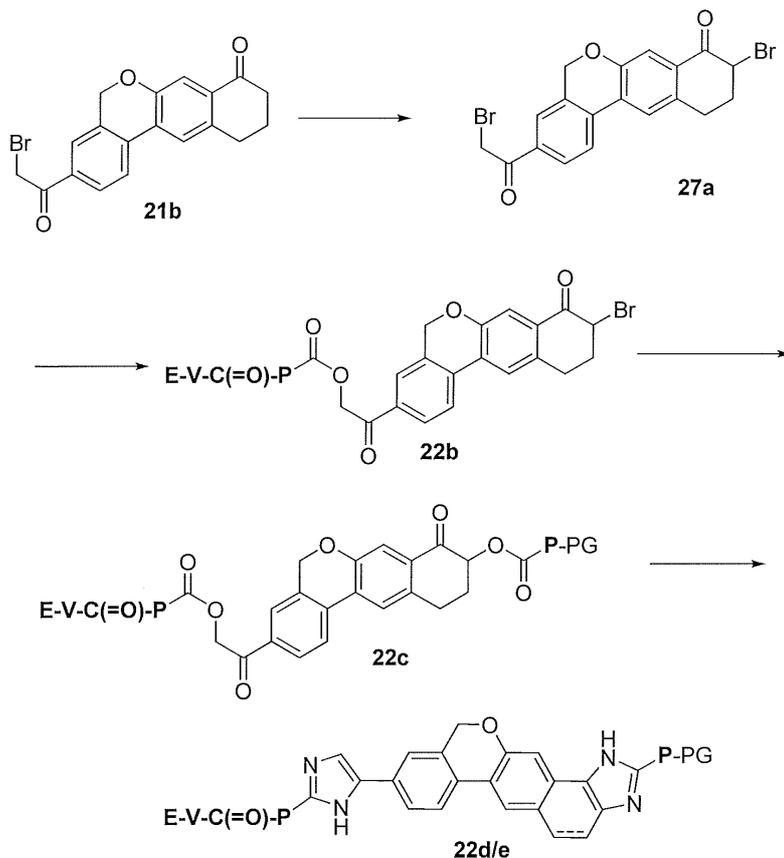
- 5 El Esquema 26 muestra una síntesis general de un E-V-C(=O)-P-R y de una molécula R¹-P-R de la invención, en la que, para los propósitos ilustrativos, R es un haloimidazol. El tratamiento del aldehído **26a** con glioxal, en presencia de hidróxido de amonio proporciona el imidazol **26b**. El tratamiento con N-bromosuccinamida o yodo proporciona el correspondiente haloimidazol **26c** y **26d** respectivamente. La separación del compuesto bis-halogenado correspondiente se puede conseguir por cromatografía HPLC preparativa. La conversión del bis-haloimidazol en el mono-haloimidazol también puede realizarse por calentamiento en presencia de sulfito sódico. Puede llevarse a cabo una funcionalización adicional del grupo P tras eliminación del grupo protector y acoplamiento con un ácido apropiado (E-V-C(=O)-OH).
- 10

Esquema 22 Síntesis representativa de R¹-P-W-P-R²

5 El Esquema 27 muestra una síntesis general alternativa de un intermedio R¹-P-W-P-R² de la invención, en el que, para los propósitos ilustrativos, R¹ y R² son grupos protectores independientes y W es una unidad de dos anillos aromáticos construida mediante una ciclación mediada por un metal de transición. La bromación de **21b** con un agente de bromación (es decir, tribromuro de piridinio) proporciona el dibromuro **27a**. El desplazamiento del bromuro primario procede entonces por la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, K₂CO₃) para proporcionar **21d**. La conversión a **21f** o **21g** puede realizarse siguiendo los métodos descritos en el Esquema 21.

10

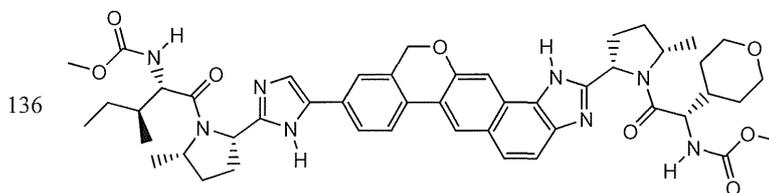
Esquema 23 Síntesis representativa de E-V-C(=O)-P-W-P-R



El Esquema 28 muestra una síntesis general alternativa de un intermedio **E-V-C(=O)-P-W-P-R** de la invención en el que, para los propósitos ilustrativos, **R** es un grupo protector y **W** es una unidad de dos anillos aromáticos. La bromación de **21b** con un agente de bromación (es decir, tribromuro de piridinio) proporciona el dibromuro **27a**. El desplazamiento del bromuro primario procede entonces por la adición de un ácido en condiciones básicas (por ejemplo, K_2CO_3) para proporcionar **22d**. La conversión a **22d** o **22e** puede realizarse siguiendo los métodos descritos en el Esquema 22.

Realización específica

En una realización, se proporciona un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación se ilustrará ahora por los siguientes Ejemplos no limitantes. Las abreviaturas siguientes se usan a través de toda la memoria descriptiva, que incluye los Ejemplos.

(ac.)	Acuoso
(g)	Gas
(s)	Sólido
°C	Grado Celsius
Ac	Acetato
ACN	Acetonitrilo

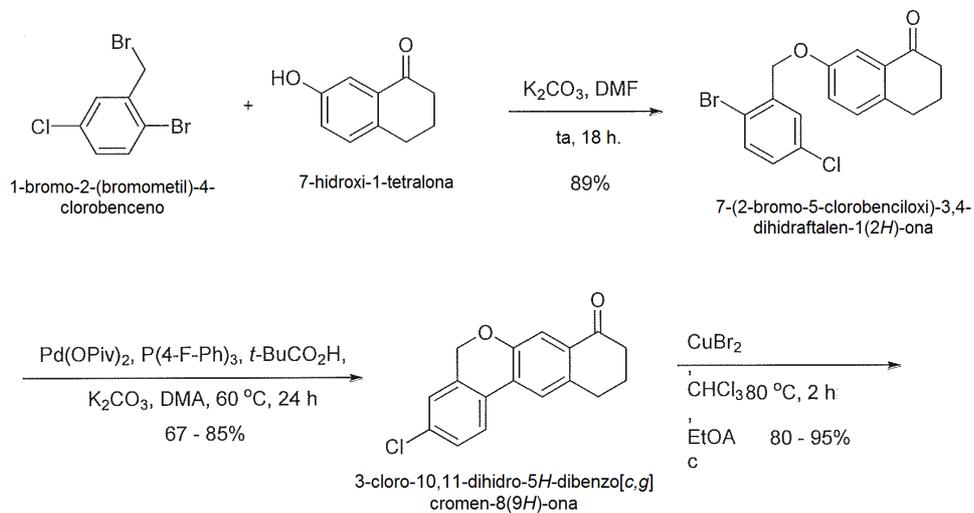
aprox.	Aproximado
Bis-pinB/(Bpin) ₂ /(pinB) ₂	Bis(pinacolato)diboro
BOC/Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
calc.	Calculado
CC ₅₀	Concentración de citotoxicidad al 50 %
COMU	hexafluorofosfato de 1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenoaminooxi)dimetilaminomorfolino)]uronio
d	Doblete
dba	dibenzalacetona
DCM	Diclorometano
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de doblete de dobletes
DIPEA/DIEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMA	N,N-Dimetilacetamida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DME	Dimetoxietano
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
DMF	Dimetilformamida
DMSO/dmso	Dimetilsulfóxido
dppf	1,1'-bis(difenilfosfanil)ferroceno
dt	Doblete de tripletes
CE ₅₀	Concentración eficaz de mitad del máximo
IEN	Ionización por electronebulización
Et	Etilo
ext.	Externo
FBS	Suero fetal bovino
g	Gramo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio Metanamio
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
hr/h	Hora
Hz	Hercio
J	Constante de acoplamiento
CLEM	Espectrometría de masas cromatografía líquida
M	Molar
m	Multiplete
m/z	Masa para cargar
M+	Pico de masa
Me	Metilo
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
min	Minuto
ml	Mililitro
mmol	Milimol
Moc	Metoxicarbonilo
EM	Espectrometría de masas
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NBS	N-Bromosuccinimida
NMM	N-Metilmorfolina
RMN	Resonancia magnética nuclear

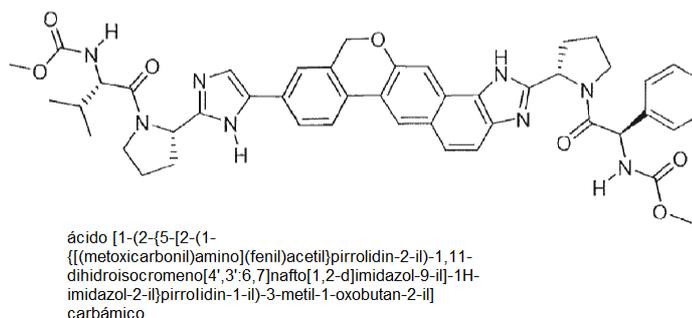
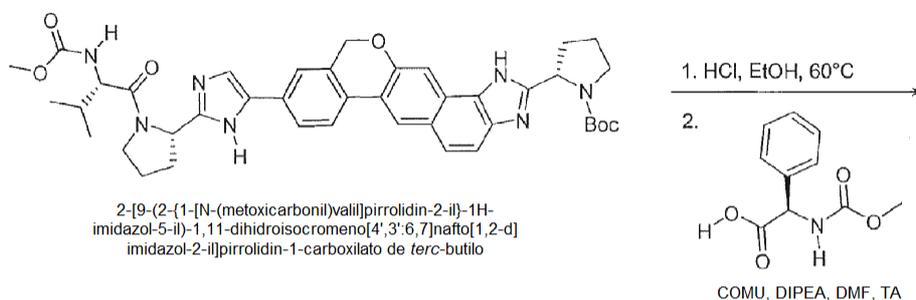
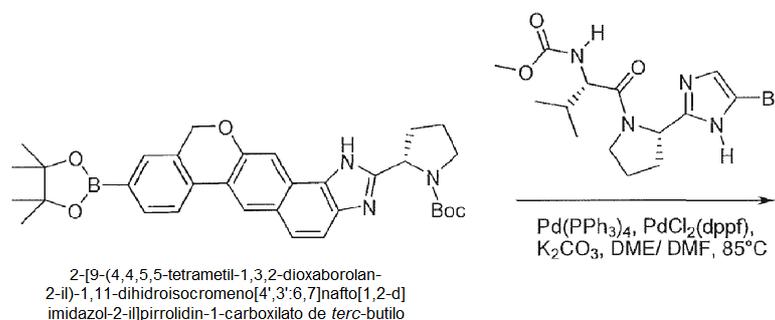
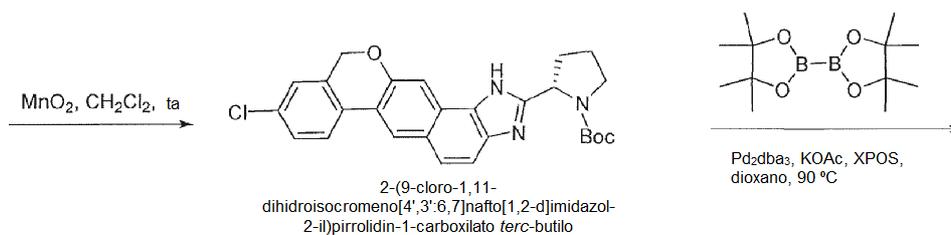
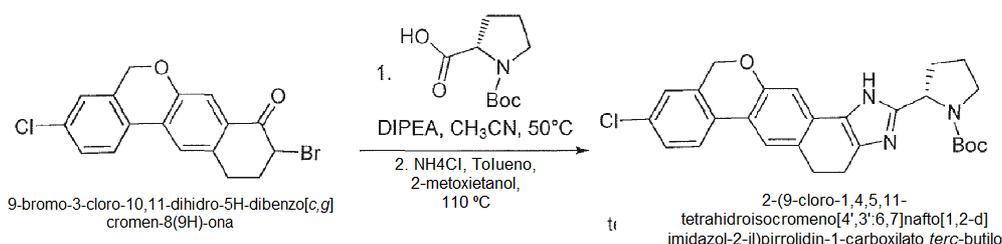
ES 2 628 350 T3

o/n	Durante toda la noche
Papp	Permeabilidad aparente
PBS	Sistema tampón fosfato
Pd/C	Paladio sobre carbono
Ph	Fenilo
Phg/PhGly	Fenil glicina
Piv	Pivalato
Pro	Prolina
pyr	Piridina
c	Cuarteto
cd	Cuarteto de dobles
cuant	Cuantitativo
quint	Quintete
ta/TA	Temperatura ambiente
s	Singlete
SPhos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo
t	Triplete
t-Bu	<i>terc</i> -Butilo
TEMPO	(2,2,6,6-Tetrametil-piperidin-1-il)oxilo
Tf	Trifluorometanosulfonato
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Threonina
TLC	Cromatografía en capa fina
tol.	Tolueno
UV	Ultravioleta
Val	Valina
p/v	Peso a volumen
p/p	Peso a peso
X-Phos/XPOS/Xphos	2-Diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenil
δ	Desplazamiento químico
μg	Microgramo
μl	Microlitro

Ejemplos

Ejemplo AA (Referencia)





3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ona: A una solución en agitación de 7-hidroxi-1-tetralona (13,9 g, 85,7 mmol) y 1-bromo-2-(bromometil)-4-clorobenceno (25,6 g, 90,0 mmol) en dimetilformamida (850 ml), se le añadió carbonato potásico (24 g, 172 mmol). La reacción se agitó en argón durante 18 horas, después se diluyó con acetato de etilo (1 l). Los extractos orgánicos se lavaron tres veces con agua y una vez con salmuera. Después, la capa orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Al aceite resultante se le añadió metanol (500 ml) y la suspensión se agitó durante treinta minutos. Se aisló por filtración 7-(2-bromo-5-clorobenciloxi)- (27,8 g, rendimiento del 89 %).

3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona: A un matraz de 1 l que contenía pivalato de paladio (II) (1,18 g, 3,8 mmol), tri(4-fluorofenil)fosfina (1,20 g, 3,8 mmol), ácido pivalico (2,33 g, 22,8 mmol) y carbonato potásico (31,8 g, 228 mmol) se le añadió una solución de 7-(2-bromo-5-clorobenciloxi)-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ona (27,8 g, 76,2 mmol) en dimetilacetamida (380 ml). El matraz se evacuó y se rellenoó con argón 5 veces y después se agitó en argón a 60 °C durante 24 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con MTBE y agua. La mezcla bifásica resultante se agitó durante 3 horas y se filtró a través de Celite, aclarando con MTBE. La capa orgánica del filtrado se separó y después se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera. Después, los orgánicos se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron, se concentraron y se purificaron por cromatografía en columna ultrarrápida (Hexanos/DCM) para producir 3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (14,4 g, rendimiento del 67 %) en forma de un sólido de color blanquecino.

9-bromo-3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona: A una mezcla de 3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (14,8 g, 52 mmol) en cloroformo (50 ml) y acetato de etilo (50 ml) se le añadió bromuro de cobre (II) (24,3 g, 104 mmol). La reacción se calentó a 80 °C durante 2 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó dos veces con una solución 5:1 acuosa, saturada de cloruro de amonio e hidróxido de amonio acuoso (~38 %) y se lavó una vez con agua. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para producir 9-bromo-3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (18,5 g, rendimiento > del 95 %) con pureza > del 95 %. Nota: Esta reacción no siempre es tan limpia. A veces hay exceso de bromación y a veces hay material de partida significativo. Estas impurezas pueden retirarse por cromatografía en columna ultrarrápida.

2-(9-cloro-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo: A una solución de ácido (2S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-pirrolidin-2-carboxílico (10,17 g, 47,25 mmol) y 9-bromo-3-cloro-10,11-dihidro-6H-nafto[2,3-c]cromen-8(9H)-ona (5,7 mg, 15,7 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se le añadió diisopropiletamina (11,11 ml, 64 mmol). La reacción se agitó a 50 C durante 4 horas y después se diluyó con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El residuo en bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir 2-(3-cloro-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-nafto[c,g]cromen-9-il) pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S)-1-*terc*-butilo (4,52 g, 58 %). A una solución de 2-(3-cloro-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-6H-nafto[2,3-c]cromen-9-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S)-1-*terc*-butilo (3,27 mg, 6,56 mmol) en una mezcla de tolueno (11 ml) y 2-metoxietanol (0,7 ml) se le añadió acetato amónico (5,06 g, 65,6 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir 2-(9-cloro-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,95 g, 61 %). CLEM-IEN⁺: calculado para C₂₇H₂₈CIN₃O_{3,42}: 477,98; observado [M+1]⁺: 478,47

2-(9-cloro-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidme-1-carboxilato de *terc*-butilo. A una solución de 2-(9-cloro-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,9 g, 3,96 mmol) en diclorometano (35 ml) se le añadió óxido de manganeso (IV) (17 g, 198 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, se diluyó con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir 2-(9-cloro-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,52 g, 81 %). CLEM-IEN⁺: calculado para C₂₇H₂₆CIN₃O₃ 42: 475,9; observado [M+1]⁺: 476,45.

2-[9-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo: Una mezcla desgasificada de 2-(9-cloro-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,52 g, 3,17 mmol), bis(pinacolato)diboro (1,21 g, 4,75 mmol), acetato potásico (934 mg, 9,52 mmol), tris(dibencilidenoacetona)paladio (116 mg, 0,13 mmol) y 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-tri-*i*-propil-1,1'-bifenilo (121 mg, 0,08 mmol) en 1,4-dioxano (16 ml) se calentó a 90 °C durante 1,5 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir 2-[9-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,7 g, 94 %)

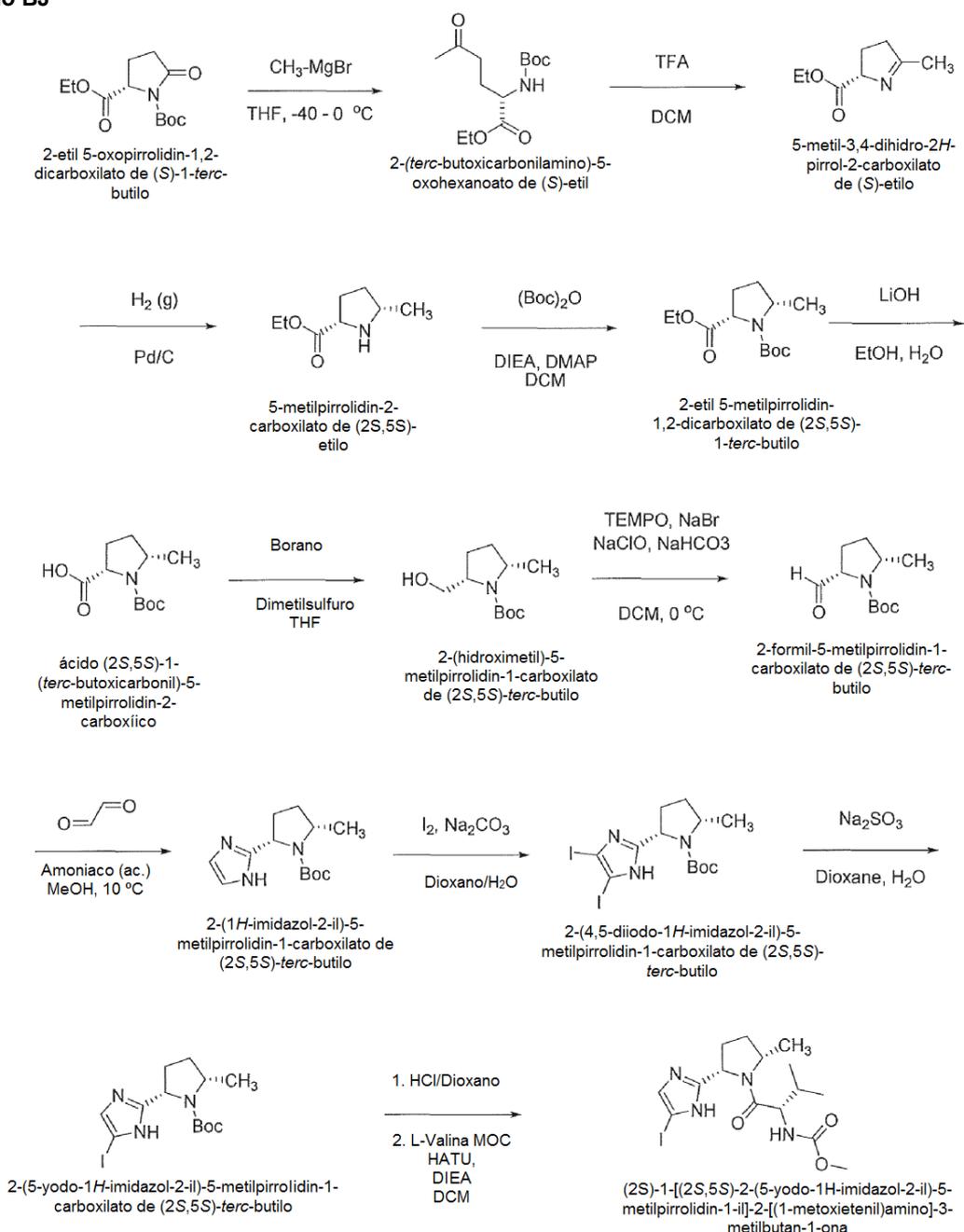
2-[9-(2-{1-[N-(metoxicarbonil)valil]pirrolidin-2-il}-1H-imidazol-5-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo: A una solución de (S)-1-((S)-2-(5-bromo-1H-imidazol-2-il)pirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-ilcarbamato de metilo (1,48 g, 3,97 mmol), 2-[9-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,88 g, 1,48 mmol), tetraquis(trifenilo fosfina)paladio (0) (191 mg, 0,16 mmol) y dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II) (242 mg, 0,33 mmol) en una mezcla de 1,2-dimetoxietano (37,0 ml) y dimetilformamida (6 ml) se le añadió una solución de carbonato potásico (2 M en agua, 5 ml, 9,93 mmol). La mezcla resultante se desgasificó y después se calentó a 85 °C en argón durante 18 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir 2-[9-(2-{1-[N-(metoxicarbonil)valil]pirrolidin-2-il}-1H-imidazol-5-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-

il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,45 mg, 59 %). CLEM-IEN⁺: calculado para C41H47N7O6 ₇₃ 7 33,86; observado [M+1]⁺: 734,87.

ácido

5 **[1-(2-(5-[2-(1-((metoxicarbonil)amino)(fenil)acetil)pirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]pirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbámico:** Una solución de 2-[9-(2-(1-[N-(metoxicarbonil)valil]pirrolidin-2-il)-1H-imidazol-5-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-2-il]pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (462 mg, 0,63 mmol), etanol (6 ml) y HCl concentrado (2 ml) se calentó a 60 °C durante 1 hora. La reacción se concentró y el material en bruto se disolvió en DCM (6 ml). Esta solución se concentró y a este material se le añadió una solución de ácido (R)-2-(metoxi-carbonilamino)-2-fenilacético (172 mg, 0,82 mmol) y COMU (311 mg, 0,73 mmol) en DMF (6 ml). A la solución resultante se le añadió diisopropiltilamina (330 µl, 1,89 mmol). Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄), se concentró y se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (Gemini, ACN/H₂O del 15 al 45 % + TFA al 0,1 %). Las fracciones del producto se liofilizaron para dar ácido [1-(2-(5-[2-(1-((metoxicarbonil)amino)(fenil)acetil)pirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]pirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbámico (231 mg, 45 %). CLEM- IEN⁺: calculado para C46H48N8O7₈: 824,92; observado [M+1]⁺: 826,00

Ejemplo BJ



2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-5-oxohexanoato de (S)-etilo. Una solución de N-Boc (S)-piroglutamato de etilo (20,0 g, 77,7 mmol) estaba en THF anhidro (150 ml) en un matraz de fondo redondo de dos bocas en argón se enfrió a -40 °C. Se añadió gota a gota una solución de bromuro de metilmagnesio (3,0 M en éter, 28,5 ml, 85,5 mmol) a la mezcla de reacción durante 30 minutos. La reacción se agitó durante 4 h a -40 °C, después durante 1 h a 0 °C. La reacción se repartió entre acetato de etilo y una solución saturada de cloruro de amonio y se acidificó con HCl 1 N. La capa acuosa se extrajo dos veces más con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato sódico. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 20 % - 40 %/hexanos) para producir 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-5-oxohexanoato de (S)-etilo en forma de un aceite viscoso y se usó directamente en la siguiente etapa.

5-metil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-carboxilato de (S)-etilo. Se trató 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-5-oxohexanoato de (S)-etilo en un matraz de 1 l con una solución de ácido trifluoro acético / diclorometano (mezcla 1:1, 100 ml). Se observó efervescencia y la mezcla se dejó en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Tiempo después del cual, los volátiles se *retiraron al vacío* para producir 5-metil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-carboxilato de (S)-etilo en forma de un aceite, y se usó directamente en la siguiente etapa.

5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo. La imina **3** en bruto, en un matraz de 1 l se disolvió con etanol (400 ml), se evacuó y se cargó con argón tres veces (3 x). Se añadió paladio sobre carbono (aprox. 750 mg, 10 % p/p, seco) y la reacción se evacuó de gas y se cargó con gas hidrógeno (3 x). La reacción se dejó en agitación en hidrógeno atmosférico durante 16 horas. La mezcla se filtró a través de un lecho de celite y el filtrado se concentró *al vacío*. Se añadió éter dietílico al aceite y se formó un precipitado. La mezcla se filtró para producir 5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo, en forma de un sólido de color blanco (10,6 g, 67,4 mmol, 86,7 % durante tres etapas). RMN ¹H (400 MHz, cdcl₃) δ 4,48 (dd, 1H), 4,27 (c, 2H), 3,92 - 3,80 (m, 1H), 2,52 - 2,36 (m, 1H), 2,32 - 2,13 (m, 2H), 1,75 - 1,60 (m, 1H), 1,51 (d, 3H), 1,30 (t, 3H).

2-etil 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,5S)-1-*terc*-butilo. A una solución de 5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo (7,0 g, 44,5 mmol) en diclorometano (250 ml), se le añadieron gota a gota sucesivamente diterc-butilanhídrido (10,7 g, 49,0 mmol), diisopropiletilamina (17,1 ml, 98,0 mmol) gota a gota durante 10 minutos y dimetil amino piridina (0,27 g, 2,23 mmol). Se observó efervescencia y la mezcla se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se lavó con HCl (250 ml, de 1 N). Después, la capa orgánica se secó con sulfato sódico. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 5 % - 25 %/hexanos) para producir 2-etil 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,5S)-1-*terc*-butilo en forma de un aceite (6,46 g, 25,1 mmol, 56%). CLEM-IEN⁺: calc. para C₁₃H₂₃NO₄: 257,16 (M⁺); Encontrado: 258,70 (M+H⁺).

ácido (2S,5S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico. A una solución de 2-etil 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,5S)-1-*terc*-butilo (6,46 g, 25,1 mmol) en etanol (20 ml) se le añadieron monohidrato de hidróxido de litio (2,11 g, 50,2 mmol) y agua desionizada (12 ml). La mezcla se dejó en agitación durante 16 horas, después se repartió entre acetato de etilo y una mezcla 1:1 de salmuera saturada y HCl 1 N. La capa acuosa se extrajo un tiempo adicional con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico y el disolvente se retiró *al vacío* para producir ácido (2S,5S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico en forma de un sólido de color blanco (cuant.) y se usó directamente en la siguiente etapa.

2-(hidroximetil)-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo. A una solución de ácido (2S,5S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico (5,91 g, 25,8 mmol) en tetrahidrofurano a 0 °C, se le añadió gota a gota borano en dimetilsulfuro (1,0 M, 3,4 ml, 34 mmol). La reacción se agitó durante 4 horas a 0 °C, después 18 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota metanol (70 ml). La reacción se calentó a temperatura ambiente y los disolventes se retiraron al vacío. El residuo se recogió en diclorometano (200 ml) y se extrajo con bicarbonato sódico saturado. La capa orgánica se secó con sulfato sódico y el disolvente se retiró *al vacío* para producir 2-(hidroximetil)-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo en forma de un aceite transparente (5,15 g, 23,9 mmol, 93 %) y se usó directamente en la siguiente etapa.

2-formil-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo. A una solución de 2-(hidroximetil)-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (5,15 g, 23,9 mmol) en diclorometano, se le añadieron TEMPO (0,075 g, 0,48 mmol), bromuro sódico (0,246 g, 2,39 mmol) y bicarbonato sódico (0,442 g, 5,26 mmol). Se añadió hipoclorito sódico (2,67 g, 35,9 mmol) de una solución al 6 % y la mezcla bifásica se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo dos veces con diclorometano (2x100 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con una solución saturada de tiosulfato sódico, se secaron con sulfato sódico y el disolvente se retiró al vacío para producir 2-formil-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (3,9 g, 18,29 mmol, 77 %) en forma de un aceite de color ligero y se usó directamente en la siguiente etapa.

2-(1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo. A una solución de 2-formil-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (3,9 g, 18,30 mmol) en MeOH (15 ml) e hidróxido de amonio (15 ml, 99,9 %), se le añadió gota a gota glioxal (11,7 ml, 40% p/v en agua, 102,40 mmol). La mezcla bifásica se volvió de color naranja y turbia. La reacción se agitó vigorosamente durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se *retiró al vacío*. La mezcla en bruto se disolvió de nuevo en acetato de etilo y se lavó con agua. La capa acuosa se lavó un tiempo adicional con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera, se

secaron con sulfato sódico y el disolvente se retiró *al vacío*. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna, acetato de etilo del 85 % al 100 % en hexanos para producir 2-(1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo en forma de un sólido de color blanquecino (3,47 g, 13,8 mmol, 75 %). CLEM-IEN⁺: calc. para C₁₃H₂₁N₃O₂: 251,16 (M⁺); Encontrado: 252,20 (M+H⁺).

5 **2-(4,5-diyodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo.** Un matraz de fondo redondo de 500 ml se cargó con 2-(1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (3,47 g, 13,8 mmol), yodo (7,7 g, 30,4 mmol) y carbonato sódico (4,54 g, 42,8 mmol). Se añadieron dioxano (70 ml) y agua (45 ml) a la mezcla y la reacción se agitó vigorosamente durante una noche en la oscuridad. Después, la reacción se repartió entre acetato de etilo y una solución acuosa al 10 % de tiosulfato sódico y se extrajo. La capa acuosa se extrajo un tiempo adicional con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico y el disolvente se retiró *al vacío*. El material en bruto se filtró a través de un lecho de sílice con acetato de etilo al 25 % en hexanos para producir 2-(4,5-diyodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo en forma de un sólido de color blanco (4,28 g, 8,50 mmol, 62 %). CLEM-IEN⁺: calc. para C₁₃H₁₉I₂N₃O₂: 502,96 (M⁺); Encontrado: 503,94 (M+H⁺).

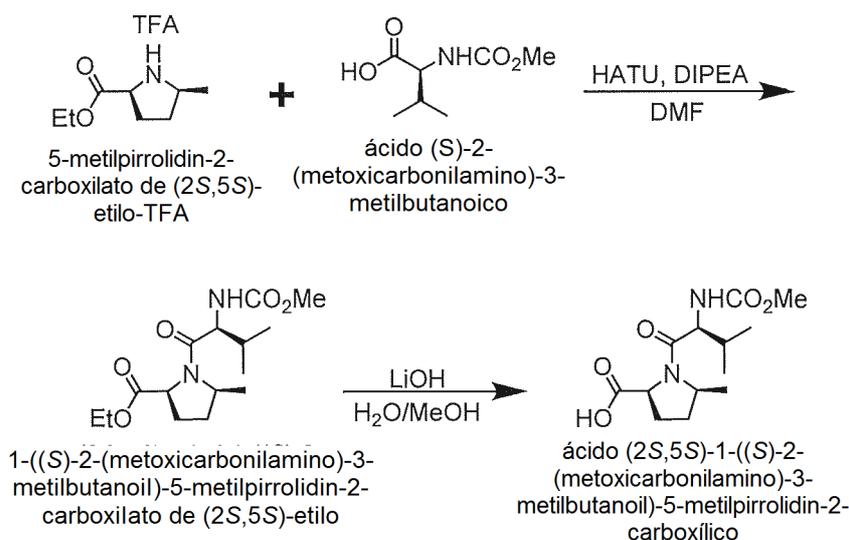
20 **2-(5-yodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo.** A una solución de 2-(4,5-diyodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (4,28 g, 8,50 mmol) en etanol (75 ml) y agua (75 ml), se le añadió tiosulfato sódico (10,72 g, 85,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 1 hora a 100 °C, 16 horas a 90 °C y 5 horas a 100 °C. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa acuosa se lavó adicionalmente con acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron. La capa orgánica se secó con sulfato sódico, se concentró y el material en bruto se purificó por cromatografía en columna para producir 2-(5-yodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo en forma de un sólido de color blanco (2,34 g, 6,20 mmol, 73 %). RMN ¹H (400 MHz, cdCl₃) δ 7,04 (s, 1H), 4,89 (dd, 1H), 3,92 (m, 1H), 2,91 (s, 1H), 2,18 - 2,06 (m, 2H), 1,78 (m, 1H), 1,52 (m, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,13 (d, 3H).

(2S)-1-[(2S,5S)-2-(5-yodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidin-1-il]-2-[(1-metoxietenil)amino]-3-metilbutan-1-ona.

Un matraz de fondo redondo se cargó con 2-(5-yodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidina-1-carboxilato de (2S,5S)-*terc*-butilo (1,5 g, 3,98 mmol) y se trató con un exceso de ácido clorhídrico (100 ml de 4,0 M en dioxano). La mezcla se agitó vigorosamente durante 3 horas, momento en el cual se formó un precipitado y el disolvente se retiró *al vacío*. A una mezcla del intermedio en bruto, ácido (S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (0,836 g, 4,77 mmol), HATU (1,81 g, 4,77 mmol) en diclorometano (25 ml), después se le añadió gota a gota diisopropiletilamina (3,46 ml, 19,9 mmol) y se agitó durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se repartió acetato de etilo y bicarbonato sódico saturado. La capa orgánica se secó con sulfato sódico, el disolvente se retiró *al vacío*. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna para producir (2S)-1-[(2S,5S)-2-(5-yodo-1H-imidazol-2-il)-5-metilpirrolidin-1-il]-2-[(1-metoxietenil)amino]-3-metilbutan-1-ona en forma de un sólido de color blanco (1,63 g, 3,75 mmol, 94 %). CLEM-IEN⁺: calc. para C₁₅H₂₃N₄O₃: 434,08 (M⁺); Encontrado: 435,51 (M+H⁺).

Ejemplo BN (Referencia)

40



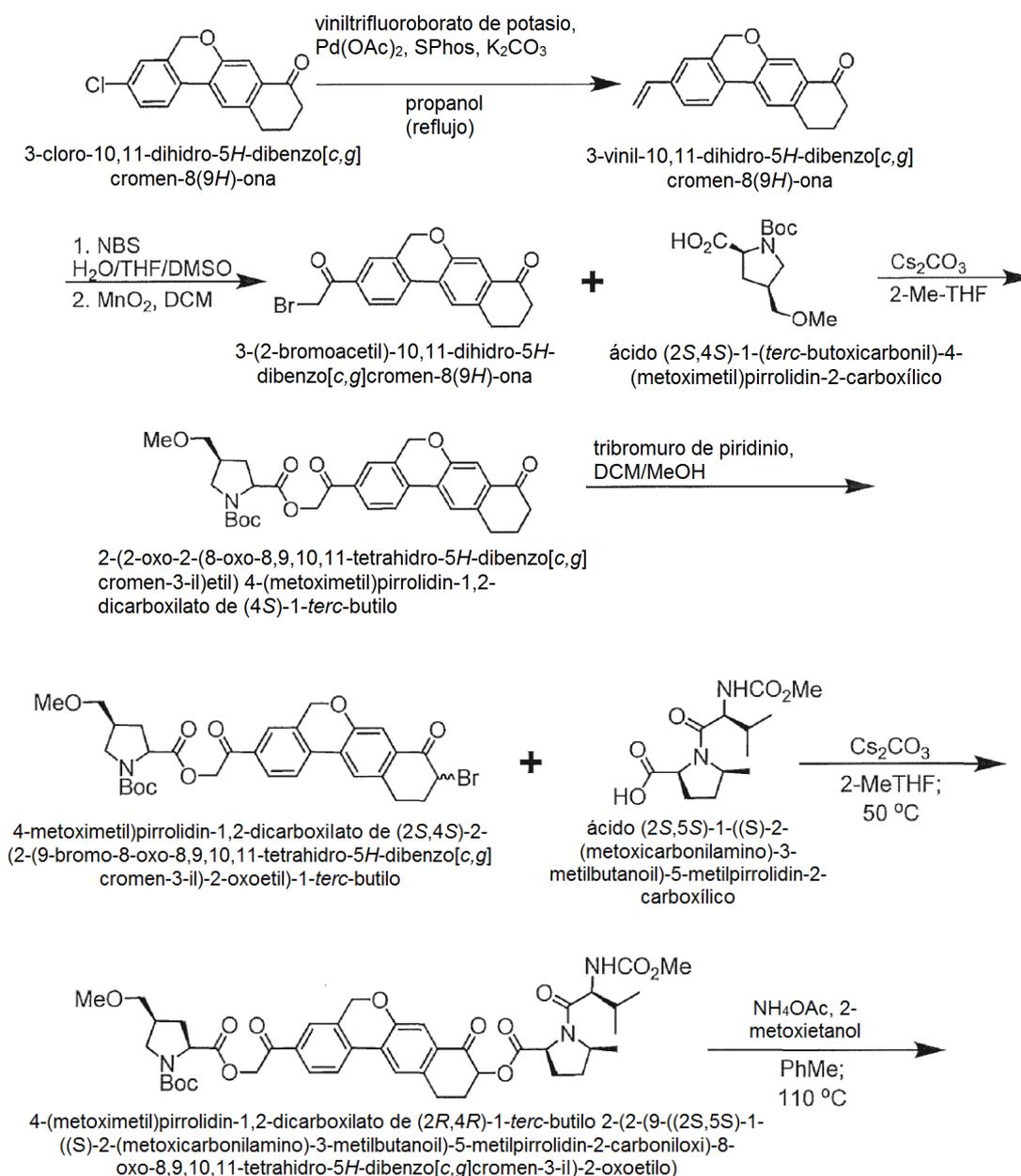
45 **1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo:** Se combinaron 5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo-TFA (10,0 g, 39,3 mmol), ácido (S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (6,88 g, 39,3 mmol) y HATU (14,9 g, 39,3 mmol) en DMF (100 ml) y se añadió DIPEA (15,0 ml, 86,5 mmol). Después de agitar durante 1 h a TA, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó

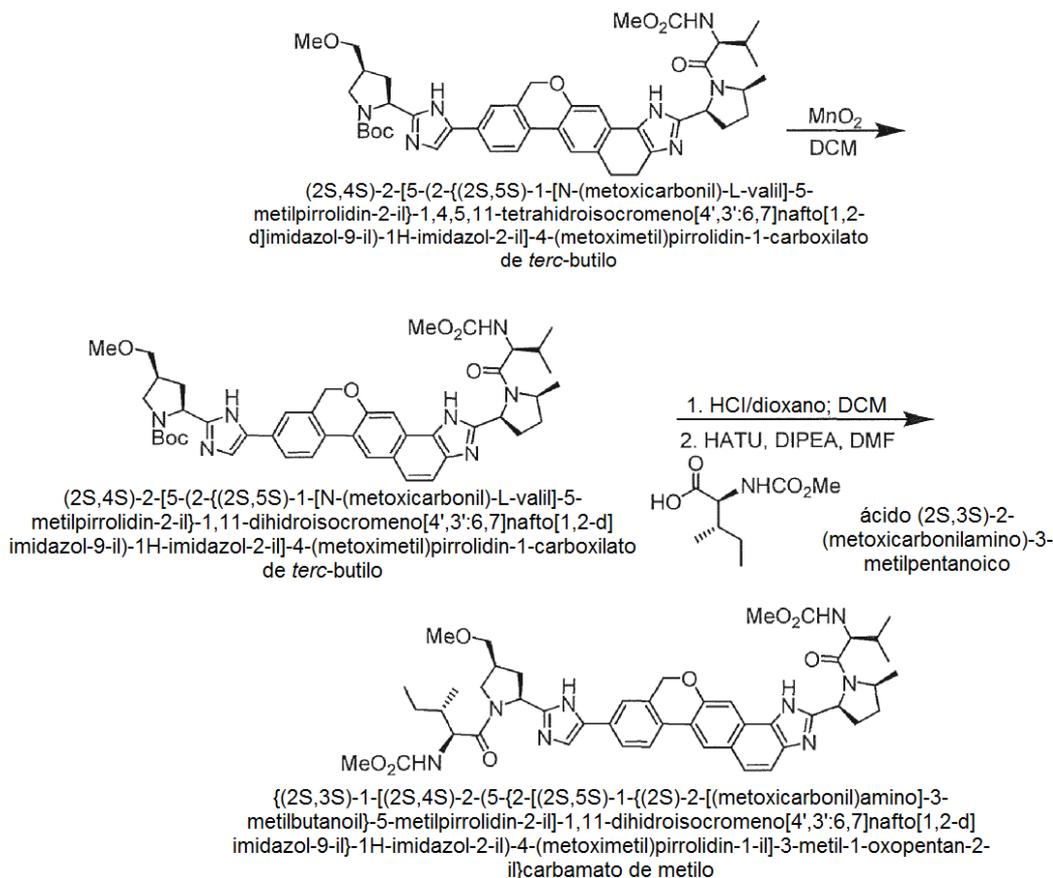
sucesivamente con HCl al 10 %, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo. El material en bruto se llevó a cabo sin purificación adicional.

- 5 **ácido (2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico:** Se suspendió 1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S,5S)-etilo (39,3 mmol, suponiendo una conversión completa de la transformación previa) en MeOH (200 ml) y se añadió LiOH acuoso (1,0 M, 100 ml, 100 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche, después se concentró a presión reducida para retirar la mayoría del MeOH. La solución acuosa se lavó 2x con DCM antes de acidificarse a pH~1-2 con HCl al 10 %.
- 10 Después, la fase acuosa ácida se extrajo 5x con EtOAc. Los extractos de EtOAc combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar ácido (2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico (6,89 g, 56 % durante 2 etapas).

Ejemplo BO (Referencia)

15





3-Vinil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona: Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 500 ml secado al horno, se enfrió en Ar, después se cargó con 3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (12,0 g, 42,1 mmol), viniltrifluoroborato potásico (8,47 g, 6,32 mmol), Pd(OAc)₂ (473 mg, 2,11 mmol), SPhos (1,74 g, 4,25 mmol), K₂CO₃ (17,5 g, 126 mmol) y propanol anhidro (120 ml). La mezcla de reacción se roció con Ar durante 16 min, después se calentó a reflujo durante 5,5 h. Tras la finalización, la mezcla de reacción se enfrió a TA y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se suspendió en DCM, después se lavó con H₂O y salmuera. La solución orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó adicionalmente a través de un tapón de sílice, eluyendo con DCM para proporcionar 3-vinil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (10,2 g, 87 %).

3-(2-Bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona: Se disolvió 3-vinil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (9,98 g, 36,1 mmol) en una solución en agitación de THF (70 ml), DMSO (70 ml) y H₂O (35 ml). Se añadió NBS (6,75 g, 37,9 mmol) en una porción individual y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 33 min. Tras la finalización, el medio de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó dos veces con H₂O y una vez con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La bromohidrina en bruto resultante se suspendió en DCM (200 ml) y se trató con MnO₂ activado (62,7 g, 722 mmol). Después de agitar durante 15 h a TA, la mezcla de reacción se filtró sobre celite y la torta de filtro se aclaró varias veces con DCM. El filtrado combinado (~400 ml) se trató con MeOH (~100 ml) y la mezcla se concentró gradualmente a presión reducida, causando un material sólido para precipitar a partir de la solución. Cuando el volumen líquido alcanzó ~200 ml, el sólido se retiró por filtración y se aclaró con MeOH. La secuencia de concentración/precipitación/filtración/aclarado se realizó 2x veces más, dando como resultado la recolección de 3 cultivos de 3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona en polvo (7,49 g, 56 % durante 2 etapas).

2-(2-oxo-2-(8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)etil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (4S)-1-*terc*-butilo: Se suspendieron 3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (7,47 g, 20,1 mmol) y ácido (2S,4S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(metoximetil)pirrolidin-2-carboxílico (5,22 g, 20,1 mmol) en 2-Me-THF (75 ml) y se trató con Cs₂CO₃ (3,27 g, 10,1 mmol). Después de agitar 4 h a TA, la mezcla de reacción se diluyó DCM diluido. La capa orgánica se lavó con H₂O. Después, la capa acuosa se volvió a extraer 2x con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc del 10 % al 50 %/DCM) para

proporcionar 2-(2-oxo-2-(8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)etil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (4S)-1-*terc*-butilo (7,73 g, 70 %).

(2S,4S)-2-(2-(9-bromo-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 4-

5 **(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-*terc*-butilo:** Se disolvió 2-(2-oxo-2-(8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)etil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (4S)-1-*terc*-butilo (7,66 g, 13,9 mmol) en una solución de DCM (100 ml) y MeOH (40 ml), después se trató con tribromuro de piridinio (4,90 g, 15,3 mmol). Después de agitar a TA durante 1,75 h, la mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó sucesivamente con HCl al 10 %, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida y el material en bruto se llevó a cabo sin purificación adicional.

2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de

15 **(2R,4R)-1-*terc*-butilo:** Se trató 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato (2S,4S)-2-(2-(9-bromo-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 1-*terc*-butilo (8,76 g, 13,94 mmol) con una solución de ácido (2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico (6,85 g, 23,92 mmol) en 2-Me-THF (70 ml) y Cs₂CO₃ (3,63 g, 11,15 mmol). La mezcla de reacción en agitación, se calentó a 50 °C durante 20 h, después se enfrió a TA y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con H₂O y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (MeOH del 0 % al 30 %/EtOAc) para proporcionar 2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2R,4R)-1-*terc*-butilo (10,47 g, 90%).

(2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-

25 **tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(metoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:** Se suspendieron 2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 4-(metoximetil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2R,4R)-1-*terc*-butilo (10,47 g, 12,56 mmol) y NH₄OAc (50,9 g, 660 mmol) en una solución 10:1 de PhMe/2-metoxietanol (132 ml). La mezcla de reacción en agitación, se calentó a 110 °C durante 4,5 h, después se enfrió a TA y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó 3x con NaHCO₃ acuosa saturada, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (MeOH del 0 % al 30 %/EtOAc) para proporcionar (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(metoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (8,33 g, 84 %).

(2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-

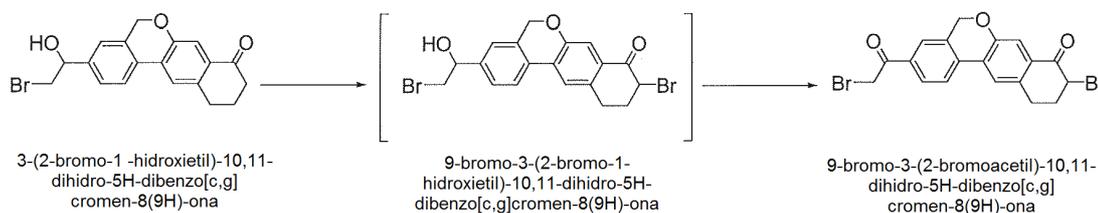
40 **dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(metoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:** Se suspendió (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(metoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (8,33 g, 1,049 mmol) en DCM y se añadió MnO₂ activado (55,0 g, 630 mmol) en una porción individual. Después de 13 h, se añadió MeOH (200 ml) y la suspensión se filtró sobre celite. La torta de filtro se lavó con MeOH (600 ml) y el filtrado se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (MeOH al 0% del 45 %/EtOAc) para proporcionar (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(methoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (4,85 g, 58 %).

{(2S,3S)-1-[(2S,4S)-2-(5-(2-((2S,5S)-1-((2S)-2-[(metoxicarbonil)amino]-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il)-4-(metoximetil)pirrolidin-1-il)-3-

50 **metil-1-oxopentan-2-il]carbamato de metilo: Se disolvió** (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-4-(metoximetil)pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (179 mg, 0,226 mmol) en DCM (4 ml) y se añadió HCl (4,0 M en dioxano, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a TA, después se concentró a presión reducida. El residuo resultante se trató con ácido (2S,3S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilpentanoico (51 mg, 0,27 mmol), HATU (95 mg, 0,25 mmol), DMF (2 ml) y DIPEA (0,39 ml, 2,3 mmol). Después de agitar durante 6 min, la reacción se interrumpió con H₂O, se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa para proporcionar {(2S,3S)-1-[(2S,4S)-2-(5-(2-((2S,5S)-1-((2S)-2-[(metoxicarbonil)amino]-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il)-4-(metoximetil)pirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxopentan-2-il]carbamato de metilo (116 mg, 59%). EM (IEN) *m/z* 864 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, cd₃od) δ 8,57 (d, *J* = 14,7 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,20 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 8,15 - 7,98 (m, 2H), 7,91 (dd, *J* = 21,8, 14,1 Hz, 2H), 7,85 - 7,69 (m, 2H), 7,69 - 7,48 (m, 2H), 5,42 - 5,12 (m, 5H), 4,34 (dd, *J* = 22,3, 13,7 Hz, 1H), 4,30 - 4,10 (m, 2H), 3,87 - 3,73 (m, 1H), 3,73 - 3,63 (m, 7H), 3,62 - 3,48 (m, 2H), 3,48 - 3,38 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 2,95 - 2,70 (m, 1H), 2,70 - 2,55 (m, 2H), 2,55 - 2,20 (m, 2H), 2,20 - 1,91 (m, 3H), 1,77 (d, *J* = 42,0 Hz, 1H), 1,65 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,43 (t, *J* = 24,6 Hz, 1H), 1,28 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 1,23 - 1,01 (m, 3H), 0,98 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 0,90 (dd, *J* = 13,1, 5,9 Hz, 10H).

65

Ejemplo DU (Referencia)

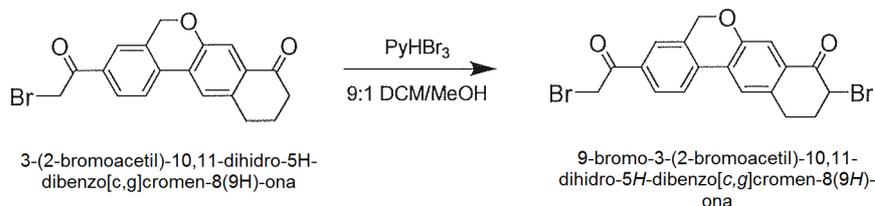


- 5 **9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona:** A 3-(2-bromo-1-hidroxi-etil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (20,3 g, 54,4 mmol) en DCM (365 ml) se le añadieron MeOH (22 ml) y tribromuro piridinio (18,24 g, 57,0 mmol). Después de 2 h, se añadió agua (100 ml) y después de agitarse brevemente, las capas se dividieron y se recogió la capa orgánica inferior. Después, la capa orgánica se lavó con HCl 1 M (100 ml) y se recogió la capa orgánica inferior que contenía 9-bromo-3-(2-bromo-1-hidroxi-etil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona. 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) 7,75 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,42 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,24 (s, 1H), 5,13 (s, 2H), 4,99-4,96 (m, 1H), 4,73 (dd, J = 4,1, 4,1 Hz, 1H), 3,69-3,66 (m, 1H), 3,58-3,53 (m, 1H), 3,35-3,27 (m, 1H), 2,96-2,90 (m, 1H), 2,58-2,44 (m, 2H), C-OH no observado.

- 15 A 9-bromo-3-(2-bromo-1-hidroxi-etil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (aprox. 54,4 mmol) en DCM (365 ml) se le añadieron bicarbonato sódico (5,45 g), bromuro sódico (6,14 g), TEMPO (16,55 mg) y agua (60 ml). La solución se enfrió entre 0-5 °C y se añadió un sistema de blanqueo al 6 % (91,5 ml). Después de 1 h, se añadió alcohol isopropílico (20 ml) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Se detuvo la agitación, las capas se separaron y la capa orgánica inferior se recogió y se concentró, retirando aproximadamente 345 g del disolvente. La suspensión se filtró y la torta se lavó con 50 ml de agua y después con 50 ml de DCM (pre-enfriado a 5 °C). Los sólidos se recogieron y se secaron al vacío para obtener 9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (18,6 g, rendimiento del 76 %). 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) δ 8,03-8,01 (m, 1H), 7,85 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 4,74 (dd, J = 4,1, 4,1 Hz, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,37-3,29 (m, 1H), 2,99-2,92 (m, 1H), 2,59-2,46 (m, 2H); 100 MHz RMN ¹³C (CDCl₃) δ 190,4, 189,6, 154,2, 136,6, 134,1, 133,9, 132,9, 131,8, 129,3, 127,2, 125,6, 124,2, 123,3, 117,0, 68,1,49,9, 31,8, 30,4, 25,5.

25

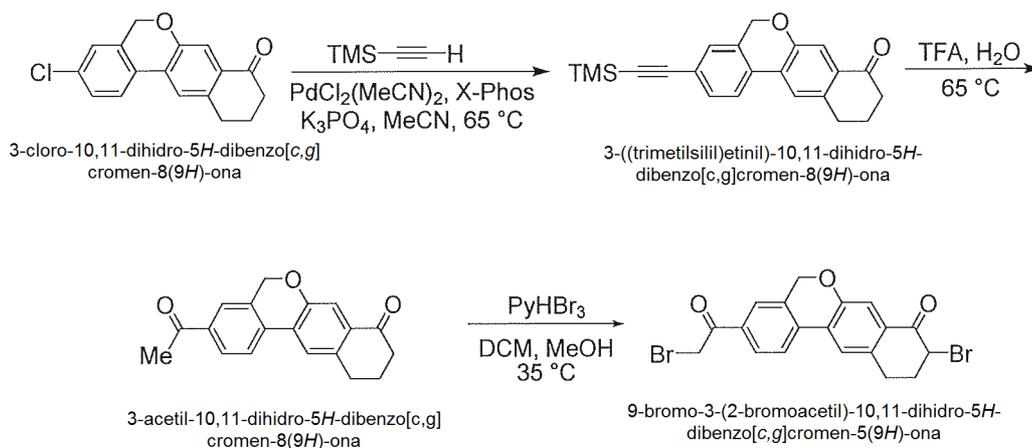
Ejemplo DV (Referencia)



- 30 **9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona:** Una mezcla de 3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (2,58 g, 6,95 mmol), tribromuro de piridinio (2,56 g, 8,0 mmol), diclorometano (22 ml) y metanol (2,5 ml) se agitó a aproximadamente 20 °C durante 3 horas para obtener una suspensión. El producto precipitado se filtró, se lavó con diclorometano (10 ml) y se secó en un horno de vacío al 40 °C para dar 9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (2,62 g, rendimiento del 84 %). 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) δ 8,03-8,01 (m, 1H), 7,85 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 4,74 (dd, J = 4,1, 4,1 Hz, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,37-3,29 (m, 1H), 2,99-2,92 (m, 1H), 2,59-2,46 (m, 2H).

35

Ejemplo DW (Referencia)

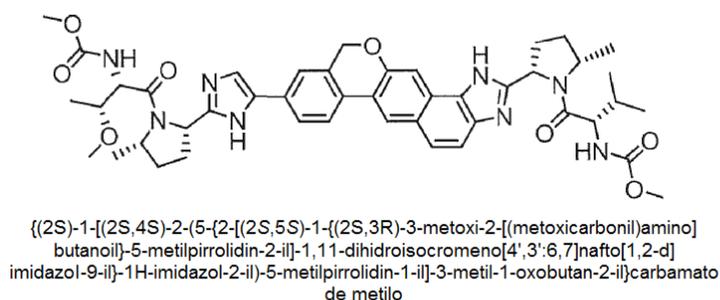
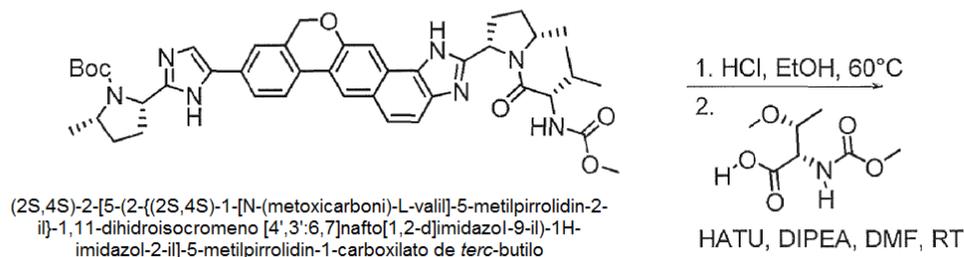
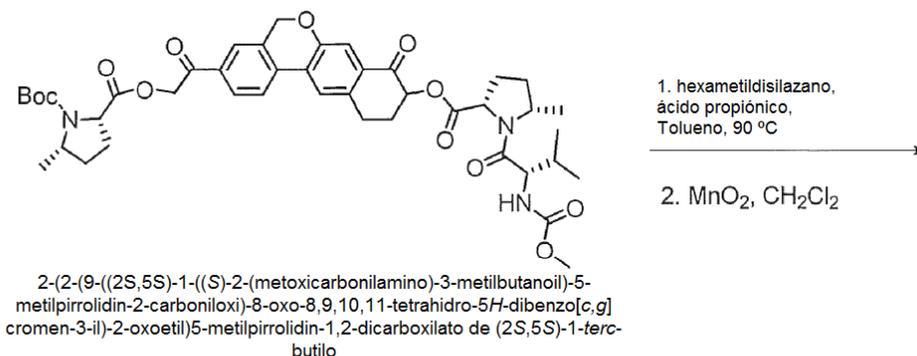
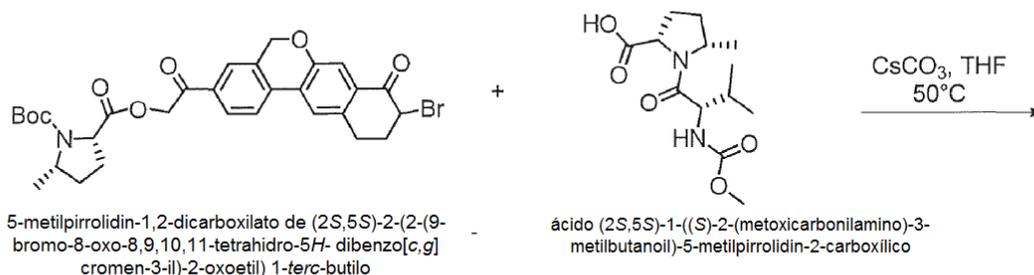
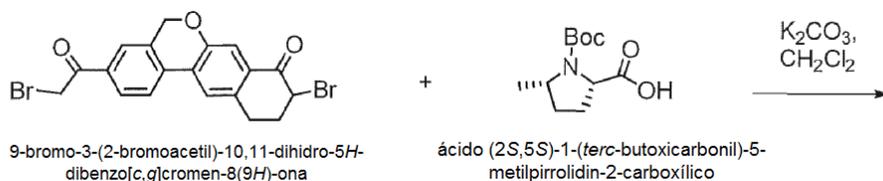


5 **3-((trimetilsilil)etnil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona:** Un matraz de 300 ml equipado con un agitador de cabeza y un condensador de reflujo en una atmósfera de nitrógeno, se cargó con 3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (10,0 g, 35,12 mmol), fosfato tripotásico anhidro en polvo (22,4 g, 105,4 mmol), XPhos (1,34 g, 2,81 mmol) y PdCl₂(MeCN)₂ (364 mg, 1,40 mmol). Se añadió acetonitrilo (140 ml) seguido de TMSacetileno (18 ml, 141 mmol). La mezcla se calentó a 65 °C. Después de 6h, la reacción se consideró finalizada y la mezcla se enfrió a 20 °C. La mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y la torta de filtro se lavó con acetonitrilo. El filtrado se concentró a aproximadamente 150 ml a presión reducida y se extrajo con heptano (50 ml, 3x100 ml). Se añadió N-Acetil cisteína (15 g) a la fase de acetonitrilo, y la mezcla se agitó durante 5 h a 45 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un embudo sinterizado y la torta de filtro se lavó con acetonitrilo. El filtrado se concentró a aproximadamente 120 ml a presión reducida. Se añadió agua (120 ml) y la mezcla se agitó durante 40 minutos a 45 °C y después se enfrió a temperatura ambiente. Después de 30 minutos la mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado para proporcionar 3-((trimetilsilil)etnil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (4,07 g, rendimiento del 33,4 %) en forma de un sólido de color amarillo: 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,65 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,47 (dd, J = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 5,06 (s, 2H), 2,95 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,67 - 2,59 (m, 2H), 2,18 - 2,08 (m, 2H), 0,26 (s, 9H).

20 **3-acetil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona:** Un vial con barra de agitación de 20 ml se cargó con 3-((trimetilsilil)etnil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (850 mg, 2,44 mmol) y ácido fórmico (9,8 ml). La solución se calentó a 65 °C. Después de 3 h, la reacción se consideró finalizada. La mezcla se concentró a presión reducida; el residuo resultante se recogió en CH₂Cl₂ y se cargó en un cartucho de gel de sílice de 25 g preempaquetado. El producto se purificó por cromatografía sobre una columna de gel de sílice de 80 g preempaquetada eluyendo con un gradiente de disolvente de EtOA del 5 % al 85 %/hexanos. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para proporcionar 3-acetil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (616 mg, 86 %): 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) δ 8,00 - 7,94 (m, 1H), 7,81 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,64 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 2,98 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,69 - 2,64 (m, 2H), 2,63 (s, 3H), 2,21 - 2,09 (m, 2H).

35 **9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona:** Un vial con una barra de agitación de 20 ml se cargó con 3-acetil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (100 mg, 0,366 mmol), 9:1 CH₂Cl₂/MeOH (3,4 ml) y tribromuro de piridinio (246 mg, 0,769 mmol). La solución se calentó a 35 °C. Después de 30 minutos, la reacción se consideró finalizada. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó secuencialmente con Na₂S₂O₃ acuoso saturado (20 ml), NaHCO₃ acuoso al 2 % (20 ml), agua (20 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida dando como resultado 9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (68 mg, 41 %): 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃) δ 8,03 - 8,01 (m, 1H), 7,85 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 4,74 (dd, J = 4,1, 4,1 Hz, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,37-3,29 (m, 1H), 2,99 - 2,92 (m, 1H), 2,59 - 2,46 (m, 2H).

Ejemplo DX (Referencia)



- 5 (2S, 5S)-2-(2-(9-bromo-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-*tert*-butilo: Se trató 9-bromo-3-(2-bromoacetil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-8(9H)-ona (1,43 g, 3,17 mmol) con una solución de ácido (2S,5S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico (800 mg, 3,49 mmol) en diclorometano (14 ml) y K_2CO_3 (658 mg, 1,18 mmol). La mezcla de reacción en agitación se agitó a

TA y se diluyó con CH₂Cl₂ y se extrajo 3X. La fase orgánica se lavó con salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar ((2S,5S)-2-(2-(9-bromo-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-*terc*-butilo (1,61 g, 84%).

5 **2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo [c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S, 5S)-1-*terc*-butilo:** Se trató ((2S,5S)-2-(2-(9-bromo-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-*terc*-butilo (1,59 g, 2,66 mmol) con una solución de ácido (2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico (1,14 g, 3,99 mmol) en THF (16 ml) y Cs₂CO₃ (692 mg, 2,12 mmol). La mezcla de reacción en agitación, se calentó a 50 °C durante 16 h, después se enfrió a TA y se diluyó con CH₂Cl₂ y se extrajo 3X. La fase orgánica se lavó con salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (EtOAc al 20 %/hexanos) para proporcionar 2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2- dicarboxilato de (2S,5S)-1-*terc*-butilo (1,26 g, 59 %).

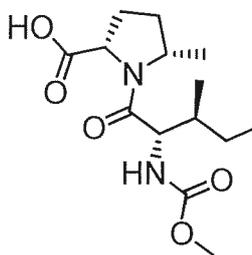
15 **(2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:** Se suspendieron 2-(2-(9-((2S,5S)-1-((S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboniloxi)-8-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-5H-dibenzo[c,g]cromen-3-il)-2-oxoetil) 5-metilpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,5S)-1-*terc*-butilo (1,2 g, 1,49 mmol), hexametildisilazano (2,5 ml, 11,9 mmol) y ácido propiónico (3,3 ml, 44,8 mmol) en PhMe (12 ml). La mezcla de reacción en agitación, se calentó a 90 °C durante 20 h, después se enfrió a TA y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua/NH₄OH al 98:2, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (MeOH del 0 % al 30 %/EtOAc) para proporcionar (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (474 mg, 41 %).

20 **(2S,4S)-2-[5-(2-((2S,4S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:** Se suspendió [4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,4,5,11-tetrahidroisocromeno (474 mg, 0,70 mmol) en DCM (5 ml) y se añadió MnO₂ activado (2,1 g, 21,7 mmol) en una porción individual. Después de agitar durante 15 h, la mezcla se filtró sobre celite. La torta de filtro se lavó con CH₂Cl₂ copioso y EtOAc y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,4S)-1-[N-(metoxicarbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno [4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metil- pirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (432 mg, 81 %) que se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

30 **((2S)-1-[(2S,4S)-2-(5-(2-[(2S,5S)-1-((2S,3R)-3-metoxi-2-[(metoxicarbonil) amino]butanoil)-5-metilpirrolidin-2-il]-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7] nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-il]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamato de metilo:** Se disolvió (2S,4S)-2-[5-(2-((2S,4S)-1-[N-(metoxi carbonil)-L-valil]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafta [1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (216 mg, 0,28 mmol) en EtOH (3 ml) y se añadió HCl (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 60 °C y después se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se trató con ácido (2S, 3R)-3-metoxi-2-(metoxicarbonilamino)butanoico (71 mg, 0,38 mmol), HATU (126 mg, 0,33 mmol) y DMF (3 ml), después se añadió gota a gota DIPEA (0,15 ml, 0,86 mmol). Después de 2 h, la mezcla se diluyó con MeOH al 10 %/EtOAc y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por HPLC de fase inversa (Gemini, ACN del 15 al 43 %/H₂O + TFA al 0,1 %). para proporcionar ((2S)-1-[(2S,4S)-2-(5-(2-[(2S,5S)-1-((2S,3R)-3-metoxi-2-[(metoxicarbonil)amino]butanoil)-5-metilpirrolidin-2-il]-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-il]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamato de metilo (96,7 mg, 41 %). RMN ¹H (400 MHz, dmso) δ 8,64 (s, 1H), 7,74 (m, Hz, 8H), 5,27 (s, 2H), 5,15 (s, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,20 - 3,22 (m, 10H), 3,17 (s, 3H), 2,22 (m, 5H), 1,84 (m, 2H), 1,47 (m, 6H), 1,31 - 0,97 (m, 3H), 0,92 (d, 3H), 0,83 (d, 3H), 0,72 (d, 3H). EM (IEN) *m/z* 835,76 [M + H]⁺.

55

Ejemplo ET (Referencia)

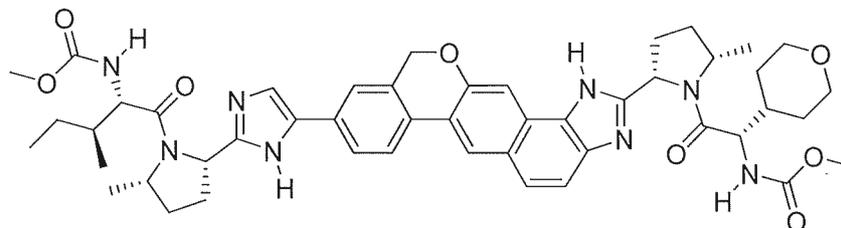


ácido (2S,5S)-1-((2S,3S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilpentanoil)-5 metilpirrolidin-2-carboxílico

- 5 **ácido (2S,5S)-1-((2S,3S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilpentanoil)-5 metilpirrolidin-2-carboxílico.** Se sintetizó de una manera similar al Ejemplo BN sustituyendo ácido (S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoico con ácido (2S,3S)-2-(metoxicarbonil-amino)-3-metilpentanoico EM (IEN) m/z 301,19 $[M + H]^+$.

Ejemplo GG

10



[(2S,3S)-1-((2S,5S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-((2S)-2-((metoxicarbonil)amino)-2-(tetrahydro-2H-piran-4-il)acetil)]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxopentan-2-il]carbamato de metilo

- 15 **[(2S,3S)-1-((2S,5S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-((2S)-2-((metoxicarbonil)amino)-2-(tetrahydro-2H-piran-4-il)acetil)]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxopentan-2-il]carbamato de metilo.** Siguiendo el Ejemplo DX, sustituyendo ácido (2S,5S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico con ácido (2S,5S)-1-((2S,3S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilpentanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico, ácido (2S,5S)-1-(S)-2-(metoxicarbonilamino)-3-metilbutanoil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico con ácido (2S,5S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico y ácido (2S,3R)-3-metoxi-2-(metoxicarbonilamino)butanoico con ácido (S)-2-(metoxicarbonilamino)-2-(tetrahydro-2H-piran-4-il)acético
- 20 proporcionó metil [(2S,3S)-1-((2S,5S)-2-[5-(2-((2S,5S)-1-((2S)-2-((metoxicarbonil)amino)-2-(tetrahydro-2H-piran-4-il)acetil)]-5-metilpirrolidin-2-il)-1,11-dihidroisocromeno[4',3':6,7]nafto[1,2-d]imidazol-9-il)-1H-imidazol-2-il]-5-metilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxopentan-2-il]carbamato (0,07 g). CLEM-IEN⁺:calc. para C₄₈H₅₈N₈O₈: 874,44 (M⁺); Encontrado: 876,07 (M+H⁺). RMN ¹H (400 MHz, cd₃od) δ (Mezcla de rotómeros) 8,33 - 8,10 (m, 2H), 8,04 - 7,68 (m, 3H), 7,68 - 7,16 (m, 5H), 5,49 (s, 1H), 5,35 - 5,20 (m, 1H), 5,20 - 4,91 (m, 3H), 4,73 - 4,61 (m, 1H), 4,25 - 4,01 (m, 3H), 3,98 - 3,65 (m, 4H), 3,57 (d, 3H), 3,36 - 3,24 (m, 1H), 3,17 - 2,97 (m, 1H), 2,91 - 2,58 (m, 2H), 2,57 - 1,76 (m, 9H), 1,52 (d, 3H), 1,41 (d, 3H), 1,28 - 0,93 (m, 5H), 0,93 - 0,56 (m, 7H).
- 25

Ensayos biológicos

- 30 **Efecto de proteínas del suero sobre la potencia del replicón:** Se realizaron ensayos de replicón en medio de cultivo celular normal (DMEM + FBS al 10 %) suplementado con concentraciones fisiológicas de seroalbúmina humana (40 mg/ml) o α-glucoproteína ácida (1 mg/ml). Las CE₅₀ en presencia de proteínas séricas humanas se comparan con la CE₅₀ en medio normal para determinar el desplazamiento factorial en la potencia.
- 35 **Citotoxicidad de células MT-4:** Se tratan células MT4 con diluciones en serie de los compuestos durante un periodo de cinco días. La viabilidad celular se mide al final del periodo de tratamiento usando el ensayo Promega CellTiter-Glo y se realiza regresión no lineal para calcular la CC₅₀.
- 40 **Concentración del compuesto asociada con células en CE₅₀:** Se incuban cultivos Huh-luc con el compuesto a concentraciones iguales a la CE₅₀. En múltiples puntos temporales (0 - 72 horas), las células se lavan 2X con medio frío y se extraen con acetonitrilo al 85 %; también se extraerá una muestra del medio en cada punto temporal. Los extractos celulares y del medio se analizan por CL/EM/EM para determinar la concentración molar de los

compuestos en cada fracción. Los compuestos representativos de la divulgación han mostrado actividad.

Solubilidad y estabilidad: La solubilidad se determina tomando una alícuota de solución madre de DMSO 10 mM y preparando el compuesto a una concentración final de 100 mM en las soluciones de medio de ensayo (PBS, pH 7,4 y HCl 0,1 N, pH 1,5) con una concentración total de DMSO del 1 %. Las soluciones de medio de ensayo se incuban a temperatura ambiente con agitación durante 1 h. Las soluciones entonces se centrifugarán y los sobrenadantes recuperados se ensayan en HPLC/UV. La solubilidad se calculará comparando la cantidad de compuesto detectada en la solución de ensayo definida en comparación con la cantidad detectada en DMSO a la misma concentración. También se determinará la estabilidad de los compuestos después de 1 hora de incubación con PBS a 37 °C.

Estabilidad en hepatocitos crioconservados humanos, de perro y de rata: Cada compuesto se incuba durante hasta 1 hora en suspensiones de hepatocitos (100 µl, 80.000 células por pocillo) a 37 °C. Los hepatocitos crioconservados se reconstituyen en el medio de incubación sin suero. La suspensión se transfiere a placas de 96 pocillos (50 µl/pocillo). Los compuestos se diluyen a 2 µM en medio de incubación y después se añaden a suspensiones de hepatocitos para iniciar la incubación. Se toman muestras a los 0, 10, 30 y 60 minutos después del inicio de la incubación y la reacción se interrumpirá con una mezcla que consiste en ácido fórmico al 0,3 % en acetonitrilo al 90 %/agua al 10 %. La concentración del compuesto en cada muestra se analiza usando CL/EM/EM. La semivida de desaparición del compuesto en suspensión de hepatocitos se determina ajustando los datos de concentración-tiempo con una ecuación exponencial monofásica. Los datos también se aumentarán en escala para representar la eliminación hepática intrínseca y/o la eliminación hepática total.

Estabilidad en la fracción S9 hepática de ser humano, de perro y de rata: Cada compuesto se incuba durante hasta 1 hora en suspensión S9 (500 µl, 3 mg de proteína/ml) a 37 °C (n = 3). Los compuestos se añaden a la suspensión S9 para iniciar la incubación. Se toman muestras a los 0, 10, 30 y 60 minutos después del inicio de la incubación. La concentración del compuesto en cada muestra se analiza usando CL/EM/EM. La semivida de desaparición del compuesto en suspensión S9 se determina ajustando los datos de concentración-tiempo con una ecuación exponencial monofásica.

Permeabilidad de Caco-2: Los compuestos se ensayan a través de un servicio contratado (Absorption Systems, Exton, PA). Los compuestos se proporcionan al contratista de una manera enmascarada. Se medirán tanto la permeabilidad directa (de A a B) como la inversa (de B a A). Se cultivan monocapas de Caco-2 hasta confluencia en membranas de policarbonato, microporosas, recubiertas con colágeno en placas de 12 pocillos Costar TRANSWELL®. Los compuestos se dosifican sobre el lado apical para la permeabilidad directa (de A a B) y se dosifican en el lado basolateral para la permeabilidad inversa (de B a A). Las células se incuban a 37 °C con CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Al inicio de la incubación y 1 h y 2 h después de la incubación, se toman alícuotas de 200 µl de la cámara de recepción y se reemplazan con tampón de ensayo fresco. La concentración del compuesto en cada muestra se determina por CL/EM/EM. Se calcula la permeabilidad aparente, Papp.

Unión de proteínas plasmáticas: Se mide la unión de proteínas plasmáticas por diálisis en equilibrio. Cada compuesto se añade al plasma no tratado a una concentración final de 2 µM. El plasma añadido y el tampón fosfato se colocan en lados opuestos de las celdas de diálisis ensambladas, que después se harán rotar lentamente en un baño de agua a 37 °C. Al final de la incubación, se determina la concentración del compuesto en el plasma y el tampón fosfato. Se calcula el porcentaje no unido usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ no unido} = 100 \cdot \left(\frac{C_f}{C_b + C_f} \right)$$

En la que C_f y C_b son las concentraciones libres y unidas determinadas como las concentraciones de tampón y plasma después de la diálisis, respectivamente.

Identificación de CYP450: Cada compuesto se incuba con cada una de 5 enzimas CYP450 humanas recombinantes, incluyendo CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C19 en presencia y ausencia de NADPH. Se tomarán muestras en serie de la mezcla de incubación al inicio de la incubación y a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos después del inicio de la incubación. La concentración del compuesto en la mezcla de incubación se determina por CL/EM/EM. El porcentaje del compuesto que queda después de la incubación en cada punto temporal se calcula por comparación con la toma de muestras al inicio de la incubación.

Estabilidad en plasma de rata, de perro, de mono y de ser humano: Los compuestos se incubarán durante hasta 2 horas en plasma (rata, perro, mono o ser humano) a 37 °C. Los compuestos se añaden al plasma a concentraciones finales de 1 y 10 µg/ml. Se toman alícuotas a los 0, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos después de añadir el compuesto. Se mide la concentración de los compuestos y los metabolitos principales en cada punto temporal por CL/EM/EM.

Evaluación de la actividad anti-HCV basada en células: Se determinó la potencia antivírica (CE₅₀) usando un ensayo indicador de replicón de HCV basado en luciferasa de *Renilla* (RLuc). Para realizar el ensayo para el

genotipo 1 y 2a JFH-1, se distribuyen células de replicón HCV 1a RLuc estables (que albergan un genotipo dicistrónico de replicón 1a H77 que codifica un indicador RLuc), células de replicón HCV 1b RLuc estables (que albergan un genotipo dicistrónico de replicón 1b Con1 que codifica un indicador RLuc) o células de replicón HCV 2a JFH-1 RLuc estables (que albergan un genotipo dicistrónico de replicón 2a JFH-1 que codifica un indicador RLuc; con L31 presente en NS5A) en 3 placas de 84 pocillos para los ensayos de CE_{50} . Para realizar el ensayo para el genotipo 2a (con M31 presente en NS5A) o 2b, los replicones NS5A quiméricos de genotipo 2a JFH-1 que codifican un indicador RLuc-Neo y el gen de NS5A de la cepa J6 de genotipo 2a o el gen de NS5A de la cepa MD2b-1 de genotipo 2b (ambos con M31 presente) respectivamente, se transfectaron de forma transitoria (t) en células Huh-Lunet o se establecieron como células de replicón de replicación estable (s) que se proporcionan. Las células se distribuyeron en placas de 384 pocillos para los ensayos de CE_{50} . Para realizar el ensayo para el genotipo 3 y 4, los replicones NS5A quiméricos de genotipo 1b Con1 que codifican un indicador Pi-RLuc y el gen de NS5A de la cepa S52 de genotipo 3a o el gen de NS5A de la cepa ED43 de genotipo 4a respectivamente, se transfretaron de forma transitoria (t) en células Huh-Lunet, que posteriormente se distribuyeron en placas de 384 pocillos. Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se diluyeron en DMSO de forma manual o usando un instrumento de pipeteo automatizado. Los compuestos diluidos 3 veces en serie se mezclaron manualmente con medio de cultivo celular y se añadieron a las células sembradas o se añadieron directamente a las células usando un instrumento automatizado. Se usó DMSO como control negativo (disolvente; sin inhibición) y se incluyó el inhibidor de proteasa ITMN-191 a una concentración $> 100 \times CE_{50}$ como control positivo. A las 72 horas, las células se lisaron y se cuantificó la actividad luciferasa de *Renilla* como se recomienda por el fabricante (Promega-Madison, WI). Se realizó regresión no lineal para calcular los valores de CE_{50} .

Para determinar la potencia antivírica (CE_{50}) contra mutantes de resistencia, se introdujeron mutaciones de resistencia, incluyendo M28T, Q30R, Q30H, Q30E, L31M, Y93C, Y93H y Y93N en el genotipo 1a NS5A, Y93H y L31V/Y93H en el genotipo 1b NS5A e Y93H en el genotipo 3a NS5A, individualmente en replicones 1a Pi-RLuc o 1b Pi-RLuc por mutagénesis dirigida al sitio. El ARN del replicón de cada mutante resistente se transfectó de forma transitoria en células cured-51 derivadas de Huh-7 y se determinó la potencia antivírica sobre estas células transfectadas como se describe anteriormente.

Estudios de farmacocinética de dosis individual IV y PO en ratas SD: La farmacocinética de los compuestos seleccionados se caracterizó en ratas Sprague-Dawley (SD) macho (250-300 g). En este estudio, dos grupos de ratas SD de raza pura sin tratamiento previo (N = 3 por grupo, en ayunas durante una noche) recibieron el compuesto seleccionado como una infusión intravenosa (IV) (1 mg/kg durante 30 minutos) a través de la vena yugular o por sonda oral (2 mg/kg). El vehículo de dosificación intravenosa (IV) fue etanol al 5 %, polietilenglicol 400 (PEG 400) al 35 % y agua al 60 % a pH 2,0. El vehículo de dosificación oral fue etanol al 5 %, PEG 400 al 55 % y tampón citrato al 40 % a pH 2,2.

Se recogieron muestras de sangre en serie (aproximadamente 0,3 ml cada una) de la vena yugular u otra vena adecuada en puntos temporales especificados. Para el grupo de infusión IV, las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y a las 0,25, 0,48, 0,58, 0,75, 1,5, 3, 6, 8, 12 y 24 horas después del inicio de la infusión. Para el grupo oral, las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y a las 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración. Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer™ que contenían EDTA-K₃ como anticoagulante y se centrifugaron a aproximadamente 4 °C para obtener el plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta el análisis por CL/EM/EM.

Se desarrolló un método bioanalítico que utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM) para el análisis del compuesto seleccionado en plasma de rata. La detección se realizó usando control seleccionado de la reacción (SRM); los iones que representan la especie precursora (M+H)⁺ se seleccionaron en el cuadrupolo 1 (Q1) y colisionaban con gas argón en la celda de colisión (Q2) para genera un ion de producto específico, que se controló posteriormente por el cuadrupolo 3 (Q3). Se prepararon la curva patrón y muestras de control de calidad en plasma de rata macho y se procesaron de la misma manera que las muestras de ensayo para generar datos cuantitativos.

Se generaron parámetros farmacocinéticos usando análisis de farmacocinética no compartimentada (Phoenix WinNonlin, versión 6.3). Se asignaron valores por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) a un valor de cero si el previo a la dosis y el tratado se extravían después de ello. Se calculó el área bajo la curva (AUC) usando la norma trapezoide lineal. La biodisponibilidad oral (% F) se determinó por comparación del área bajo la curva (AUC) del compuesto y/o un metabolito generado en el plasma después de la administración oral con la generada después de administración intravenosa.

60

ES 2 628 350 T3

Tabla 1A

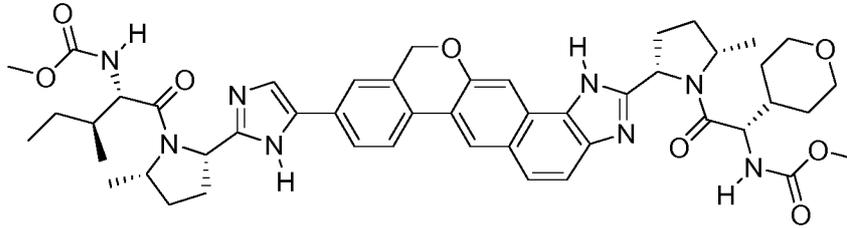
N.º	N.º Ej.	1b (nM)	1a	1a Q30R	2a JFH	2a J6 (t)	2a J6 (s)	2b (t)	2b (s)	3a (t)	3a (s)	4a (s)	1a (nM)	1a Q30R (nM)
136	GG	0,022	D	D	D			D	D		D	D	0,015	0,032
Intervalos de actividad: A ≥ 44 nM, B = 1 nM - 43,999 nM, C = 0,1 nM - 0,999 nM, D < 0,1 nM.														

Tabla 1B

N.º	N.º Ej.	2a JFH (nM)	2a J6 (t) (nM)	2a J6 (s) (nM)	2b (t) (nM)	2b (s) (nM)	3a (t) (nM)	3a (s) (nM)	4a (s) (nM)	% F de rata
136	IGG	0,020			0,044	0,083		0,038	0013	22,1
Intervalos de actividad: A > 44 nM, B = 1 nM - 43,999 nM, C = 0,1 nM - 0,999 nM, D < 0,1 nM.										

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:

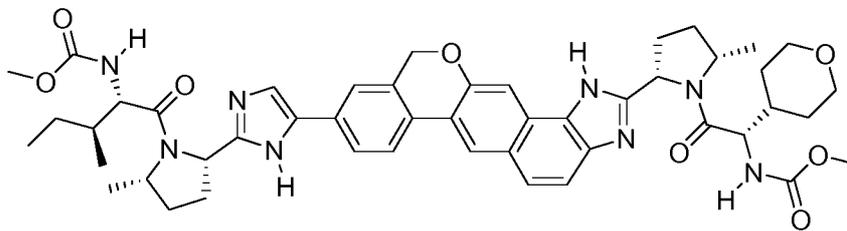


5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de fórmula:

10



3. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la hepatitis C.

15

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, formulada para administración oral.

20

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, formulada en forma de comprimido.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la hepatitis C.