

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 216**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/381** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61K 31/4196** (2006.01)

**A61K 31/513** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/US2012/055621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13040492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12768967 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2709613**

54 Título: **Métodos para el tratamiento del VHC**

30 Prioridad:

**16.09.2011 US 201161535885 P**

**18.11.2011 US 201161561753 P**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)  
c/o Gilead Sciences, Inc, 333 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**RAY, ADRIAN S.;  
WATKINS, WILLIAM J.;  
LINK, JOHN O.;  
OLDACH, DAVID W. y  
DELANEY, IV, WILLIAM E.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 659 216 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

Métodos para el tratamiento del VHC

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a combinaciones de moléculas terapéuticas útiles para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C.

10 **Antecedentes de la invención**

La hepatitis es una enfermedad que aparece en todo el mundo. La hepatitis es generalmente de naturaleza vírica, aunque, si se considera un estado de inflamación crónica del hígado, existen otras causas no infecciosas conocidas. La hepatitis vírica es de lejos la forma más común de hepatitis. Los Centros para el Control de Enfermedades de los EE.UU. han estimado que al menos el 1,8 % de la población de los EE.UU. tiene indicios serológicos de infección por el VHC, en la mayoría de los casos asociados a una infección activa crónica. El VHC es un virus de ARN de cadena positiva que pertenece a la familia Flaviviridae y tiene una relación más estrecha con los pestivirus que incluyen el virus del cólera del cerdo y el virus de la diarrea vírica bovina.

20 El genoma del VHC es un ARN de sentido positivo monocatenario de aproximadamente 9.600 pb que codifica una poliproteína de 3009-3030 aminoácidos, que se escinde simultáneamente y después de la traducción por una proteínasa celular y dos víricas en proteínas víricas maduras (núcleo, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Se cree que las proteínas estructurales, E1 y E2, están embebidas en una envoltura lipídica vírica y forman heterodímeros estables. Se cree que la proteína núcleo estructural interactúa con el genoma de ARN vírico para formar la nucleocápside. Las proteínas no estructurales designadas NS2 a NS5 incluyen proteínas con funciones enzimáticas implicadas en la replicación vírica y el procesamiento de proteínas, incluyendo una polimerasa, proteasa y helicasa. El VHC se replica a través de la producción de un molde de ARN de cadena negativa complementario.

30 El VHC es un virus genéticamente diverso. Dentro de un mismo paciente infectado, pueden identificarse muchos virus variantes, conduciendo a la descripción 'enjambre vírico' o cuasiespecies víricas. Dentro de la población humana global, el VHC también es genéticamente diverso, con al menos 6 'genotipos' principales identificados (Genotipos 1-6) y numerosos subtipos (es decir, VHC Genotipo 1a y 1b). Los genotipos de VHC se definen por análisis filogénico genómico y se diagnostican (en un paciente determinado) mediante ensayos de diagnóstico basados en la secuencia de ARN del VHC.

35 La principal vía de infección por el VHC es la exposición a sangre. La magnitud de la infección por el VHC como un problema sanitario se ilustra por la prevalencia entre grupos de alto riesgo. Por ejemplo, en algunas encuestas, del 60 % al 90 % de los hemofílicos y más del 80 % de los consumidores de drogas por vía intravenosa en los países occidentales tenían infección crónica por VHC. Para los consumidores de drogas intravenosas, la prevalencia varía desde aproximadamente el 28 % al 80 % dependiendo de la población estudiada. La proporción de nuevas infecciones por VHC asociadas a la transfusión de sangre o de productos de sangre se ha reducido notablemente debido a los avances farmacéuticos y al uso generalizado de ensayos serológicos y de detección de ARN sensibles utilizados para cribar donantes de sangre, sin embargo, ya se ha establecido una gran cohorte de personas envejecidas con infección crónica.

45 Un tratamiento disponible para la infección por el VHC es interferón- $\alpha$  pegilado (PEG-IFN  $\alpha$ 1a o PEG-IFN  $\alpha$ 1b), que, bajo las directrices actuales de tratamiento, se administra semanalmente mediante inyección subcutánea durante 24 a 48 semanas, dependiendo del genotipo vírico de VHC que se está tratando. Aunque puede esperarse que más del 50 % de los pacientes con infección por el VHC Genotipo 1 tenga una supresión de la viremia de VHC al finalizar la terapia de 48 semanas, una proporción significativa de estos pacientes tendrá una recaída vírica. En consecuencia, una Respuesta Viroológica Sostenida (RVS, definida como la negatividad de ARN de VHC 24 semanas después del cese del tratamiento y se considera equivalente a la 'curación') solo se alcanza en el 30-40 % de las infecciones por VHC Genotipo 1 tratadas con PEG-IFN solo. Además, el tratamiento con PEG-IFN + RBV no es bien tolerado, con un perfil de acontecimientos adversos que incluye síntomas similares a la gripe, trombocitopenia, anemia y efectos secundarios psiquiátricos graves. Aunque el tratamiento con el tratamiento de referencia actual no es óptimo, muchos pacientes quedan excluidos de cualquier terapia que se inicie debido a comorbilidades comunes en poblaciones infectadas por VHC, incluyendo trastornos psiquiátricos, enfermedad hepática avanzada y abuso de sustancias.

60 La ribavirina es un fármaco antivírico análogo de nucleósido. La ribavirina normalmente se toma por vía oral (por la boca) dos veces al día. El mecanismo exacto de la ribavirina se desconoce. Sin embargo, se cree que cuando la ribavirina entra en una célula se fosforila; después actúa como un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). Los inhibidores de la IMPDH tales como la ribavirina reducen la síntesis y el almacenamiento intracelulares de guanina, un "componente básico" nucleotídico necesario para la producción de ADN y ARN, inhibiendo de este modo la replicación vírica. Los inhibidores de la IMPDH también interfieren con la reproducción de células de proliferación rápida y células con una alta tasa de recambio de proteínas. El tratamiento

con monoterapia de ribavirina tiene poco efecto sobre los niveles de ARN de VHC, pero se asocia a una disminución de la alanina transferasa (ALT) en suero. Esta observación indica que la ribavirina puede no estar actuando como un agente antivírico, sino más bien como un modulador de la función del sistema inmunitario. Ribavirina solo está aprobada para su uso, para la infección por el VHC, en combinación con IFN.

5 El tratamiento con la combinación de PEG-IFN más ribavirina mejora las tasas de RVS por encima de las observadas con PEG-IFN solo, en gran parte debido a la reducción en la frecuencia de recaída vírica en el cese de la terapia. Las tasas de RVS de un gran ensayo clínico para pacientes tratados con PEG-IFN/ribavirina con infección por el VHC Genotipo 1 han oscilado en un 40-55 %. En la actualidad, la terapia con PEG-IFN/ribavirina se considera el 'tratamiento de referencia' para la infección crónica por VHC. Sin embargo, se espera que el tratamiento de referencia cambie rápidamente en un futuro próximo con la aprobación de agentes antivíricos de acción directa que, en principio, se utilizan en combinación con PEG-IFN/ribavirina.

15 Por desgracia, los diferentes genotipos de VHC responden de forma diferente a la terapia con PEG-IFN/ribavirina; por ejemplo, el VHC genotipo 1 es más resistente a la terapia que los tipos 2 y 3. Adicionalmente, muchos tratamientos actuales para el VHC producen efectos secundarios no deseados. Por tanto, en la actualidad existe una necesidad de nuevas terapias antivíricas. En particular, existe una necesidad de nuevas terapias antivíricas que produzcan menos efectos secundarios no deseados, que sean más eficaces contra una gama de genotipos de VHC o que tengan programas de dosificación menos complicados, es decir, que requieran la administración de agentes menos veces durante un día.

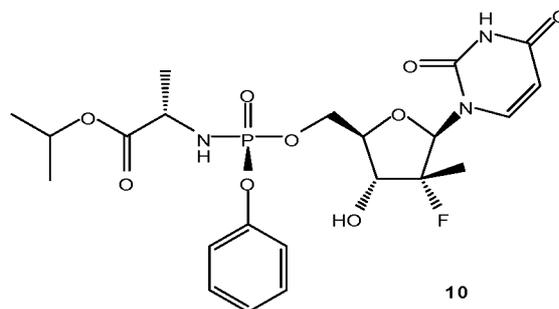
25 Lawitz E.J., et al., *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 57, págs. 24-31 notifica que un compuesto GS-5885 (correspondiente al Compuesto 6 en el presente documento, un inhibidor de la polimerasa NS5A del VHC) tiene actividad antivírica en pacientes infectados por el VHC genotipo 1a y 2b.

30 Lam A.M., et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, págs. 3187-3196 notifica que un compuesto PSI-7851 (correspondiente al Compuesto 10 en el presente documento, un inhibidor nucleosídico de la polimerasa NS5B del VHC) es un inhibidor pan-genotípico de la replicación del VHC.

### 30 Sumario de la invención

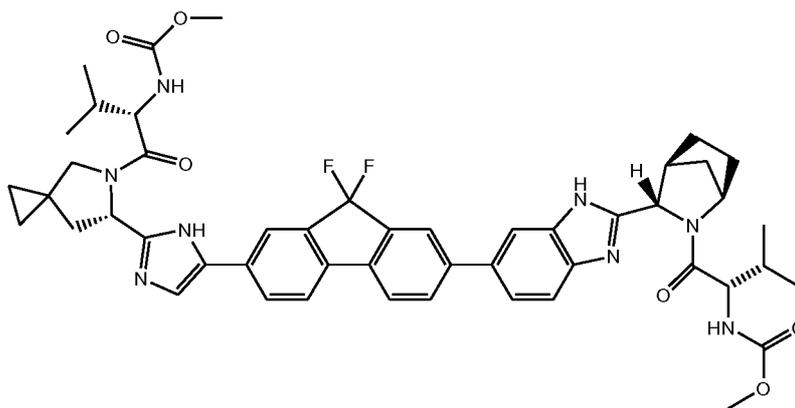
La presente invención proporciona composiciones y su uso en métodos terapéuticos que son útiles para el tratamiento de infecciones víricas (por ejemplo, el VHC). Ciertas composiciones de la invención producen menos efectos secundarios no deseados, son más eficaces contra una gama de genotipos de VHC, reducen el potencial de rebote vírico debido a la selección de resistencia y tienen programas de dosificación acortados menos complicados que las terapias disponibles actualmente.

En consecuencia, en una realización la invención proporciona una composición que comprende: 1) Compuesto 10



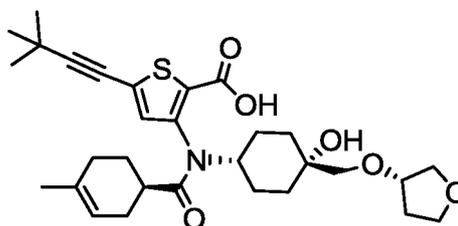
40

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y 2) Compuesto 6



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otra realización, la invención proporciona la composición anterior que comprende adicionalmente Compuesto 5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otras realizaciones, una composición como se ha definido anteriormente comprende adicionalmente uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición anterior puede formularse como una forma de dosificación unitaria para la administración una vez al día y/o puede formularse para la administración oral, opcionalmente en forma de un comprimido.

15 En otra realización, la invención proporciona una composición como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia médica.

20 En otra realización, la invención proporciona una composición como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por el VHC. En una realización, la composición para el uso anterior no es para la administración con un interferón. En otra realización, la composición para el uso anterior es para la administración con ribavirina.

25 Las composiciones y su uso de acuerdo con la invención pueden proporcionar "sinergia" y "efectos sinérgicos", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos (incluyendo los dos o más Compuestos de Combinación) se usan juntos es mayor que la suma de los efectos resultado del uso de los compuestos por separado.

30 Las composiciones y su uso de acuerdo con la invención son beneficiosos porque proporcionan tratamientos para una amplia gama de genotipos de VHC y porque provocan menos efectos secundarios o menos graves que las terapias actuales contra el VHC (por ejemplo, tratamientos que incluyen la administración de interferón). Adicionalmente, ciertas combinaciones de compuestos (por ejemplo, los Compuestos 10 y 6 y los Compuestos 10, 5 y 6) pueden proporcionar una Respuesta Viroológica Sostenida (RVS) que es una significativamente mayor que la conseguida mediante las terapias actuales (por ejemplo, terapias contra el VHC). Por ejemplo, algunas combinaciones de compuestos pueden proporcionar una RVS que es de al menos aproximadamente el 70 % o de al menos aproximadamente el 80 %.

### Descripción detallada de la invención

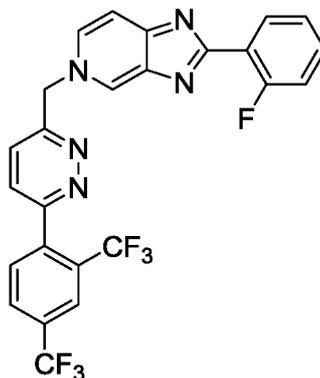
#### Definiciones

40 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases como se usan en el presente documento tienen por objeto tener los siguientes significados. El hecho de que un término o frase particular no se defina específicamente no debe correlacionarse con indefinición o claridad deficiente, sino que más bien los términos en el presente documento se usan en su sentido corriente. Cuando se usan nombres comerciales en el presente documento, los solicitantes tienen por objeto incluir independientemente el producto de nombre comercial y el

principio o principios farmacéuticos activos del producto de nombre comercial.

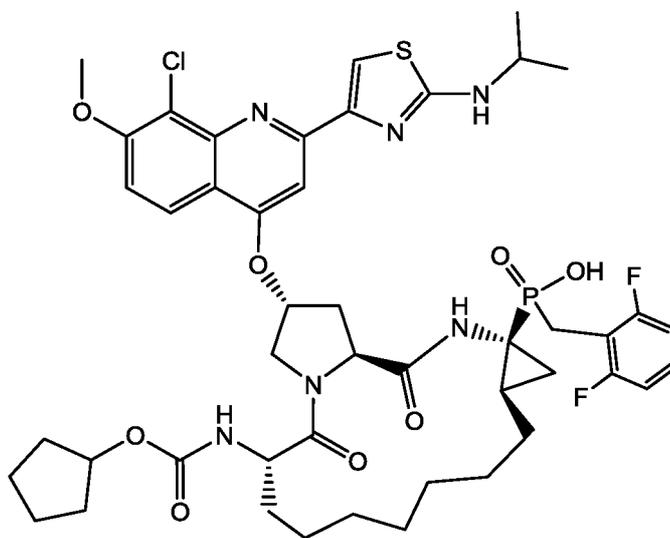
Como se usa en el presente documento, la expresión "Compuestos de Combinación" se refiere al Compuesto 10 y al Compuesto 6, y, si están presentes o se usan, al Compuesto 1, al Compuesto 2, al Compuesto 3, al Compuesto 4, al Compuesto 5, al Compuesto 7, al Compuesto 9, al Compuesto 11, al Compuesto 12, al Compuesto 13, al Compuesto 14, al Compuesto 15 y al Compuesto 16.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 1 es:



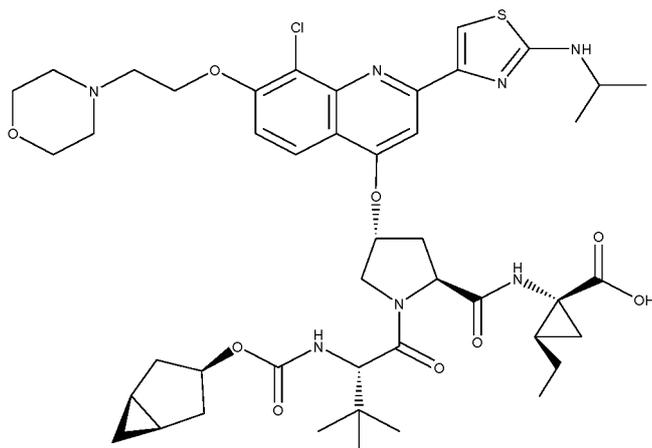
El Compuesto 1 también puede denominarse 5-((6-(2,4-bis(trifluorometil)fenil)piridazin-3-il)metil)-2-(2-fluorofenil)-5H-imidazo[4,5-c]piridina o 5H-imidazo[4,5-c]piridina, 5-[[6-[2,4-bis(trifluorometil)fenil]piridazin-3-il]metil]-2-(2-fluorofenilo).

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 2 es:

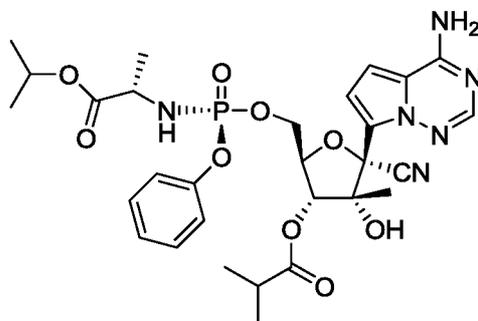


El Compuesto 2 también puede denominarse ácido (2R,6S,13aR,14aS,16aS)-2-(8-cloro-2-(2-(isopropilamino)tiazol-4-il)-7-metoxiquinolin-4-iloxi)-6-(ciclopentiloxicarbonilamino)-5,16-dioxooctadecahidrociclopropa[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazaciclopentadecin-14a-il(2,6-difluorobencil)fosfínico.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 3 es:

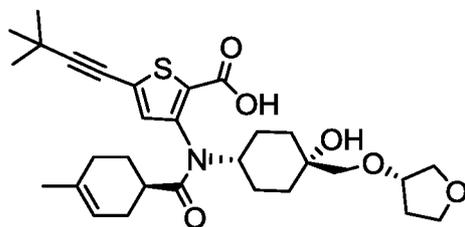


Como se usa en el presente documento, el Compuesto 4 es:



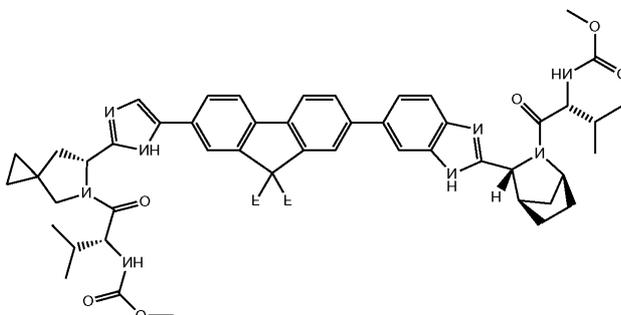
5

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 5 es:

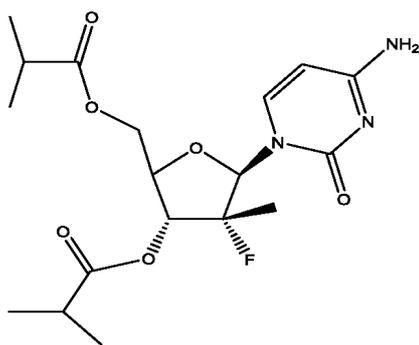


10

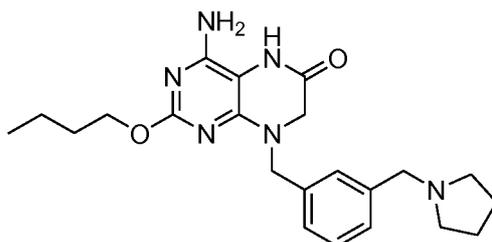
Como se usa en el presente documento, el Compuesto 6 es:



15 Como se usa en el presente documento, el Compuesto 7 es:



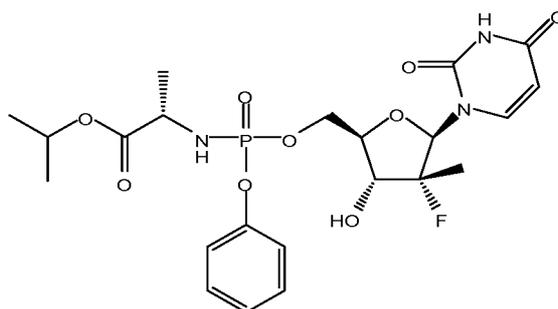
Como se usa en el presente documento, el Compuesto 8 es:



8.

5

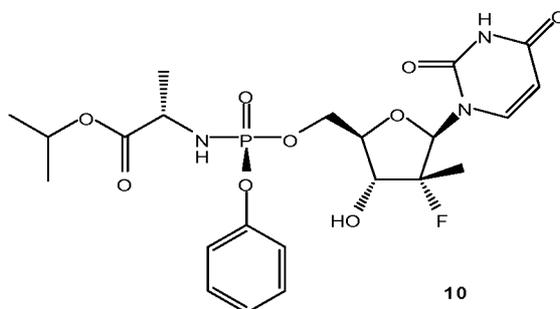
Como se usa en el presente documento, el Compuesto 9 (diastereómero en P) es:



9.

10 Con respecto al Compuesto 9, se hace referencia al documento US 7.964.580 y al documento US 2010/0298257, con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 9.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 10 (isómero S del Compuesto 9) es:

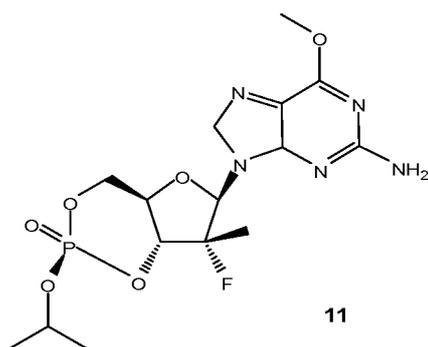


10

15

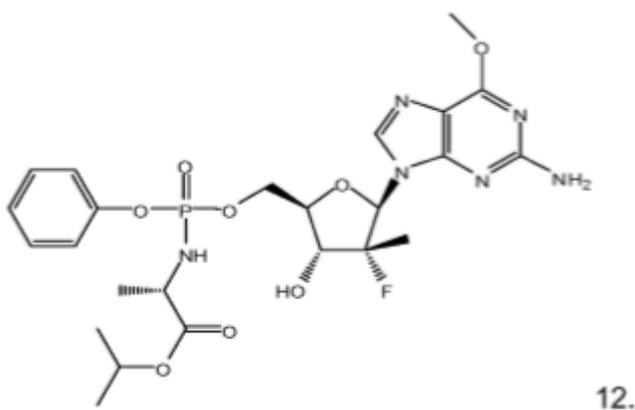
Con respecto al Compuesto 10, se hace referencia al documento US 7.964.580 y al documento US 2010/0298257, con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 10.

20 Como se usa en el presente documento, el Compuesto 11 es:



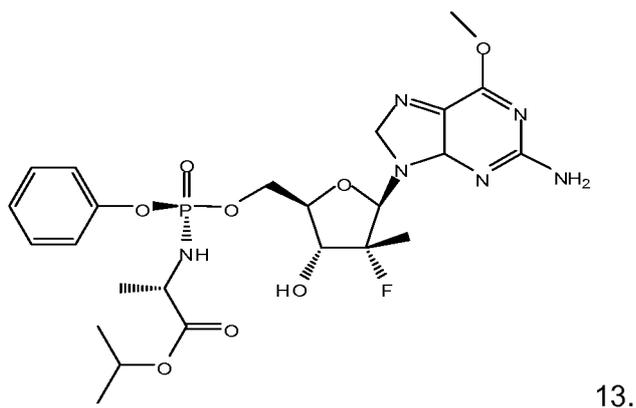
Con respecto al Compuesto 11, se hace referencia al documento US 2010/0081628 con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 11.

5 Como se usa en el presente documento, el Compuesto 12 (diastereómero en P) es:



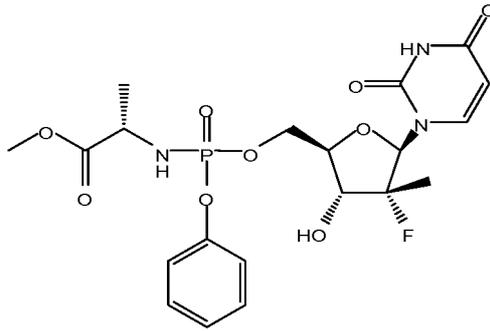
10 Con respecto al Compuesto 12, se hace referencia al documento US 20110015146 con respecto a la fabricación y purificación del compuesto 12.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 13 (diastereómero S del Compuesto 12 en P) es:



15 Con respecto al Compuesto 13, se hace referencia al documento US 20110015146 con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 13.

20 Como se usa en el presente documento, el Compuesto 14 es:

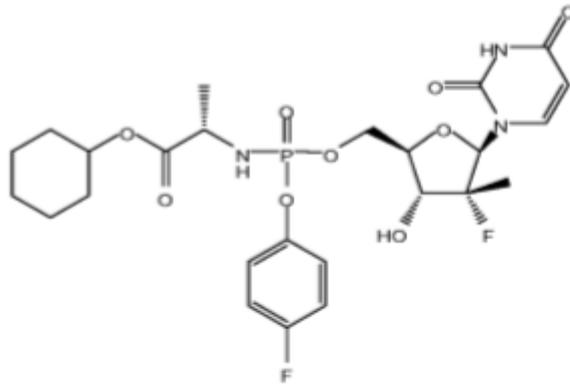


14.

Con respecto al Compuesto 14, se hace referencia al documento US 7.964.580 con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 14.

5

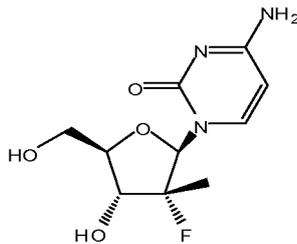
Como se usa en el presente documento, el Compuesto 15 es:



15.

10 Con respecto al Compuesto 15, se hace referencia al documento US 7.964.580 con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 15.

Como se usa en el presente documento, el Compuesto 16 es:

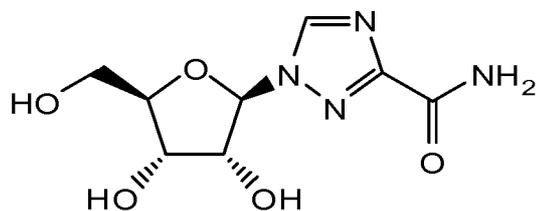


16.

15

Con respecto al Compuesto 16, se hace referencia al documento US 7.429.572 con respecto a la fabricación y purificación del Compuesto 16.

20 Con respecto a la ribavirina, se hace referencia al documento EP 0 093 401 B1, con respecto a un proceso para la fabricación, así como a la nomenclatura concerniente a la ribavirina. Como se usa en el presente documento, la ribavirina se refiere a:



Ribavirina.

25

La ribavirina también se denomina 1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida, 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxiamida; 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida; COPEGUS (Roche); DRG-0028; HSDB 6513; ICN 1229; MegaRibavirina (por ejemplo, en formulaciones de 100 mg de ribavirina/ml); NSC 163039; RAVANEX (BioPartners); REBETOL (Schering-Plough; Aesca; Bayer Schering Pharma; Essex; Pfizer; Trading Pharma; Zuellig Pharma); Ribamida; RIBAMIDIL (Biopharma, Rusia); RIBASPHERE (Three Rivers Pharmaceuticals); Ribavirin; Ribavirina; Tribavirina; VILONA (Valeant Pharmaceuticals; ICN Pharmaceuticals); VIRAMID (ICN Pharmaceuticals; Alfa Wassermann); VIRAZOL (Valeant Pharmaceuticals); y VIRIZADOL (UCI-farma, Sao Bernardo do Campo, San Pablo, Brasil). Además, como se usa en el presente documento la ribavirina incluye análogos de ribavirina, incluyendo la taribavirina (VIRAMIDINA, ICN 3142).

El término "interferón" incluye 1) interferones, por ejemplo, rIFN-alfa 2b pegilado (PEG-Intron, Merck & Co., Inc.), rIFN-alfa 2a pegilado (PEGASYS®, Hoffmann-La Roche Inc.), rIFN-alfa 2b (INTRON® A, Merck & Co., Inc.), rIFN alfa 2a (Roferon®-A, Hoffmann-La Roche Inc.), interferón alfa (MULTIFERON® Viranative AB Corporation, OPC-18, Alfaferone, Alfaferone, subalin), interferón alfacon-1 (Valeant), interferón alfa-n1 (Wellferon™, Glaxo Wellcome), interferón alfa-n3 (ALFERON®-Hemispherx Biopharma, Inc.), interferón-beta-1a (AVONEX® Biogen Idec, DL-8234 Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd), interferón-omega (omega DUROS®, Alza Corporation, Intarcia Therapeutics, Inc.; Biomed 510, Intarcia Therapeutics, Inc.), albinterferón alfa-2b (ALBUFERON®, Human Genome Sciences, INC.), IFN alfa-2b XL, BLX-883 (LOCTERON®, Biolex Therapeutics, INC.), DA-3021, interferón alfa-2b glucosilado (AVI-005), PEG-INFERGEN®, Amgen, Inc., interferón lambda-1 pegilado (tipo III) (IL-29 PEGilado) y BELEROFON®, Nautilus Biotech.

La expresión "terapia de combinación" significa composiciones o métodos o usos o similares que incorporan los dos o más Compuestos de Combinación. La terapia de combinación también puede incorporar otros principios activos además de los dos o más Compuestos de Combinación incluyendo, pero no limitado a: ribavirina, un interferón, un inhibidor de la alfa-glucosidasa 1, un hepatoprotector, un agonista del receptor de tipo Toll (TLR)-7, un inhibidor de la ciclofilina, un inhibidor de la entrada vírica del VHC, un inhibidor de la maduración del VHC y un inhibidor del IRES del VHC.

La expresión "principio activo" significa un componente de una terapia de combinación que ejerce o es capaz de ejercer un efecto farmacéutico incluyendo cualquiera de los Compuestos de Combinación, ribavirina, un interferón, un inhibidor de la alfa-glucosidasa 1, un hepatoprotector, un agonista del TLR-7, un inhibidor de la ciclofilina, un inhibidor de la entrada vírica del VHC, un inhibidor de la maduración del VHC y un inhibidor del IRES del VHC.

El término "tratar" y equivalentes gramaticales del mismo, cuando se usan en el contexto del tratamiento de una enfermedad, significa ralentizar o detener la progresión de una enfermedad o mejorar al menos un síntoma de una enfermedad, más preferentemente mejorar más de un síntoma de una enfermedad. Por ejemplo, un paciente con VHC puede experimentar una mejora en uno o todos los siguientes síntomas que pueden estar asociados a la infección por el VHC: aumento de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, ictericia, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, vómitos y diarrea. El tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C puede incluir la reducción de la carga vírica del VHC en un ser humano infectado con el VHC.

Algunos de los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros quirales o, de otra manera, pueden ser capaces de existir como estereoisómeros múltiples. El alcance de la presente invención incluye mezclas de estereoisómeros, así como enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente/diastereoméricamente enriquecidas. También se incluyen dentro del alcance de la invención los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas que se muestran en el presente documento, así como cualquier mezcla total o parcialmente equilibrada de los mismos. La presente invención también incluye los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas que se muestran en el presente documento como mezclas con isómeros de los mismos en los que uno o más centros quirales están invertidos. Las definiciones y convenciones estereoquímicas utilizadas en el presente documento generalmente siguen S.P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York.; Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz planopolarizada. 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 alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para indicar el signo de rotación de la luz planopolarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro.

Un estereoisómero específico también puede denominarse un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros con frecuencia se denomina una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse cuando no ha habido ninguna estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o un proceso químicos. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

### Combinaciones

La presente invención abarca combinaciones de los dos o más Compuestos de Combinación. Se proporciona a continuación la Tabla I que muestra combinaciones posibles de dos vías (Combinación 17), de tres vías (Combinaciones 32-55), de cuatro vías (Combinaciones 62-91) y de cinco vías (Combinaciones 94-113) del Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 5, el Compuesto 6, el Compuesto 7 y el Compuesto 10. El Compuesto 4, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16 son inhibidores nucleosídicos de la polimerasa NS5B del VHC y las combinaciones de Compuestos de Combinación con más frecuencia incluirán solo uno de entre el Compuesto 4, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16 (Compuesto 10 - véase la Columna 6 de la Tabla I).

TABLA I

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
Combinación 17					X	
Combinación 32	X				X	
Combinación 42		X			X	
Combinación 48			X		X	
Combinación 55					X	X
Combinación 62	X	X			X	
Combinación 68	X		X		X	
Combinación 73	X			X	X	
Combinación 75	X				X	X
Combinación 78		X	X		X	
Combinación 83		X		X	X	
Combinación 85		X			X	X
Combinación 87			X	X	X	
Combinación 89			X		X	X
Combinación 91				X	X	X
Combinación 94	X	X	X		X	
Combinación 99	X	X		X	X	
Combinación 101	X	X			X	X
Combinación 103	X		X	X	X	
Combinación 105	X		X		X	X
Combinación 107	X			X	X	X
Combinación 108		X	X	X	X	
Combinación 110		X	X		X	X
Combinación 112		X		X	X	X
Combinación 113			X	X	X	X

Composiciones

Un aspecto de la presente invención incluye una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, comprendiendo la composición el Compuesto 6 y comprendiendo adicionalmente el Compuesto 10.

5 Otro aspecto de la presente invención incluye una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, comprendiendo la composición el Compuesto 6 y comprendiendo adicionalmente el Compuesto 5 y el Compuesto 10.

10 Sales

Los Compuestos de Combinación y otros principios activos pueden estar en forma de una sal. Normalmente, pero no absolutamente, las sales de los Compuestos de Combinación y otros principios activos son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales incluidas dentro de la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los Compuestos de Combinación y/u otros principios activos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición de ácidos inorgánicos tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato y nitrato; sales de adición de ácidos orgánicos tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glicolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato y ascorbato; sales con aminoácidos ácidos tales como aspartato y glutamato; sales de metales alcalinos tales como sal de sodio y sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de magnesio y sal de calcio; sal de amonio; sales básicas orgánicas tales como sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de dicitohexilamina y sal de N,N'-dibenciletilendiamina; y sales con aminoácidos básicos tales como sal de lisina y sal de arginina. Las sales pueden ser en algunos casos hidratos o solvatos de etanol.

25 Formulaciones farmacéuticas

Los Compuestos de Combinación y/u otros principios activos pueden formularse con vehículos o excipientes convencionales, que pueden seleccionarse de acuerdo con la práctica habitual.

30 Los comprimidos normalmente contienen excipientes, sustancias de deslizamiento, cargas, aglutinantes y similares. Pueden prepararse formulaciones acuosas en forma estéril y cuando tengan por objeto la entrega mediante una administración distinta de la oral generalmente serán isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes tales como los que se exponen en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, carbohidratos tales como dextrina, hidroxixelulosa, hidroxialquilmtilcelulosa, ácido esteárico y similares.

35 El pH de las formulaciones varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero habitualmente es de aproximadamente 7 a 10.

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

45 Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las vías de administración que se exponen a continuación. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Pueden encontrarse en general técnicas y formulaciones en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Dichos métodos incluyen la etapa de asociar un principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones pueden prepararse asociando uniforme e íntimamente uno o más principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

50 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades individuales tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de un principio activo; en forma de un polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Un principio activo también puede administrarse en forma de un bolo, electuario o pasta.

60 Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse mediante compresión en una máquina adecuada de un principio activo en una forma que fluye libremente tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del principio activo en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y opcionalmente

65

pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo.

Para la administración en el ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las formulaciones pueden aplicarse preferentemente en forma de una pomada o crema tópica que contenga un principio o principios activos en una cantidad de, por ejemplo, del 0,075 al 20 % p/p (incluyendo el principio o principios activos en un intervalo entre el 0,1 % y el 20 % en incrementos del 0,1 % p/p tal como el 0,6 % p/p, el 0,7 % p/p, etc.), preferentemente del 0,2 al 15 % p/p y mucho más preferentemente del 0,5 al 10 % p/p. Cuando se formula en una pomada, un principio activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o una miscible en agua. Como alternativa, un principio activo puede formularse en una crema con una base de crema aceite en agua.

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

La fase oleosa de las emulsiones de Compuestos de Combinación y/u otros principios activos puede estar constituida por ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender meramente un emulsionante (conocido de otro modo como emulgente), deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y 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 estabilizante o estabilizantes constituyen la denominada cera emulsionante y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase dispersa oleosa de las formulaciones en crema.

Los emulgentes y estabilizantes de la emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60 (ICI Americas Inc.), Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato de sodio.

La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas. La crema debe ser preferentemente un producto no graso, que no manche y lavable, con una consistencia adecuada para evitar fugas de los tubos u otros recipientes. Pueden usarse, ésteres de alquilo mono o dibásicos, de cadena lineal o ramificada, tales como 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, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina filante y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más principios activos junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen principios activos pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración previsto. Cuando se usan para su uso oral pueden prepararse, por ejemplo, comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones que tienen por objeto su 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 incluyendo agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación agradable al paladar. Son aceptables comprimidos que contienen un principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o sodio, lactosa, lactosa monohidrato, croscarmelosa de sodio, povidona, fosfato de calcio o de sodio; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como celulosa, celulosa microcristalina, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas incluyendo la microencapsulación para retrasar la disgregación y adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo una acción sostenida durante un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Las formulaciones para su uso oral pueden también presentarse en forma de cápsulas de gelatina dura en las que un principio o principios activos se mezclan con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, fosfato de calcio o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que un principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitano). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante la suspensión del principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abeja, parafina sólida o alcohol cetílico. Pueden añadirse edulcorantes, tales como aquellos expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable al paladar. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Polvos dispersables y gránulos de la invención adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan un principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Se ejemplifican agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados mediante los desvelados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábica y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitano, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilen sorbitano. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante, un aromatizante o un agente colorante.

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

La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación temporalizada destinada a la administración por vía oral a seres humanos puede contener aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo combinado con una cantidad apropiada y conveniente de material de vehículo que puede variar de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 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 destinada a la infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg de un principio activo por mililitro de solución con el fin de que pueda producirse la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

Las formulaciones adecuadas para la administración en el ojo incluyen colirios en los que el principio activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para un principio activo. Un principio activo está preferentemente presente en dichas formulaciones en una concentración del 0,5 al 20 %, ventajosamente del 0,5 al 10 %, en particular de aproximadamente el 1,5 % en peso/peso.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden un principio activo en una base aromatizada, por lo general sacarosa y goma arábica o goma de tragacanto; pastillas que comprenden un principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden un principio activo en un vehículo líquido adecuado.

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

5 Las formulaciones adecuadas para la administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500  $\mu\text{m}$  (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500  $\mu\text{m}$  en incrementos tales como de 0,5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , etc.), que se administran por inhalación rápida a través de la fosa nasal o por inhalación a través de la boca de manera que alcancen 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 entregarse con otros agentes terapéuticos tales como compuestos utilizados hasta ahora en el tratamiento o la profilaxis de afecciones como se describen en el presente documento.

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

20 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente. Son formulaciones de dosificación unitaria preferidas aquellas que contienen una dosis diaria o una sub-dosis diaria unitaria, como se han citado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas, de un principio activo.

30 Debe entenderse que, además de los ingredientes mencionados en particular anteriormente, las formulaciones de Compuestos de Combinación y/u otros principios activos pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, las adecuadas para la administración por vía oral pueden incluir agentes aromatizantes.

35 También pueden formularse Compuestos de Combinación y otros principios activos para proporcionar una liberación controlada de un principio activo para permitir una dosificación menos frecuente o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un principio activo. En consecuencia, la invención también proporciona composiciones que comprenden los dos o más Compuestos de Combinación formulados para la liberación sostenida o controlada.

#### 40 Dosificaciones

45 La dosis eficaz de un principio activo depende al menos de la naturaleza de la afección que se trata, de la toxicidad, de si el compuesto se está usando profilácticamente (dosis más bajas) o contra una enfermedad o afección activa, del método de entrega y de la formulación farmacéutica, y puede ser determinada por el facultativo usando estudios de aumento de dosis convencionales.

A modo de ejemplo, pueden formularse composiciones de la invención (por ejemplo, comprimidos) para proporcionar dosis eficaces. Por ejemplo, con respecto al Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 1,0 mg a 100 mg, de 5 mg a 40 mg, de 30 mg a 50 mg, o 20 mg o 40 mg y puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 6, el Compuesto 4, el Compuesto 5, el Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto al Compuesto 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 25 mg a 800 mg, de 50 mg a 400 mg o de 60 mg a 300 mg o de 70 mg a 200 mg o pueden ser de 150 mg y puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 3, el Compuesto 6, el Compuesto 4, el Compuesto 5, el Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto al Compuesto 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 10 mg a 1000 mg, o de 50 a 400 mg, o de 100 mg a 400 mg o de 200 mg a 400 mg y puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 6, el Compuesto 4, el Compuesto 5, Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto al Compuesto 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 25 mg a 400 mg o de 25 mg a 200 mg puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de

entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 6, el Compuesto 5 y el Compuesto 7. Con respecto al Compuesto 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 50 mg a 1000 mg o de 100 mg a 750 mg, puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 6, el Compuesto 4, el Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto al Compuesto 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender de 1 mg a 500 mg o de 3 mg a 300 mg o de 3 mg a 200 mg o de 3 mg a 100 mg o de 10 mg a 90 mg o de 30 mg a 90 mg, puede adaptarse para administrarse una o más veces al día a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 4, el Compuesto 5, el Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto al Compuesto 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la composición puede comprender desde 100 microgramos hasta 3000 mg, desde 25 mg hasta 2000 mg, o desde 50 mg hasta 1000 mg y puede adaptarse para administrarse una o más veces al día (por ejemplo, cuatro veces al día) a un ser humano que lo necesite en combinación con uno cualquiera o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 4, el Compuesto 5, el Compuesto 6, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16. Con respecto a los Compuestos 9 y 10, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, la composición puede comprender de 10 mg a 1000 mg por día (de acuerdo con el documento US 2010/0298257). Con respecto al Compuesto 11, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, la composición puede comprender de 1 mg a 1000 mg por día (de acuerdo con el documento US 2010/0081628). Puede ser necesario ajustar las dosis para los Compuestos 1-7 que se coadministran para tener en cuenta las posibles interacciones fármaco-fármaco. Por ejemplo, aunque no parece que el Compuesto 1 afecte a los sistemas de metabolización de fármacos, el Compuesto 2 parece tener el efecto de aumentar la exposición del Compuesto 1 aproximadamente 2-3 veces. Por tanto, se podría anticipar una reducción de la dosis (por ejemplo, 2 veces – 3 veces) del Compuesto 1 cuando el Compuesto 1 se combina con el Compuesto 2. En combinación con el Compuesto 16, el Compuesto 2 parece tener el efecto de aumentar la exposición del Compuesto 6 aproximadamente 5 veces, por lo que podría anticiparse una reducción de la dosis (por ejemplo, 3 veces – 5 veces) del Compuesto 16 cuando el Compuesto 16 se dosifica con el Compuesto 2. Por tanto, una dosis de 10 mg del Compuesto 6 cuando se coadministra con el Compuesto 2 se aproxima a una dosis de 30 mg.

Los dos o más Compuestos de Combinación pueden administrarse en combinación con Ribavirina en cantidades de aproximadamente 800 mg, 1000 mg o 1200 mg por día en dosis individuales o múltiples (por ejemplo, de aproximadamente 400 mg, 500 mg o 600 mg dos veces al día).

#### Uso de Combinaciones de la invención

En la práctica de este aspecto de la invención, los Compuestos de Combinación puede usarse en las dosis establecidas anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención incluye el Compuesto 10 para su uso en un método de tratamiento de infecciones por VHC, en el que el Compuesto 10 se usa en combinación con el Compuesto 6.

Otro aspecto de la presente invención incluye el Compuesto 10 para su uso en un método de tratamiento de infecciones por VHC, en el que el Compuesto 10 se usa en combinación con el Compuesto 5 y el Compuesto 6.

#### Vías y modos de administración

Pueden adaptarse dos o más de entre el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto 3, el Compuesto 4, el Compuesto 5, el Compuesto 6, el Compuesto 7, el Compuesto 9, el Compuesto 10, el Compuesto 11, el Compuesto 12, el Compuesto 13, el Compuesto 14, el Compuesto 15 y el Compuesto 16 y cualquier otro componente de una terapia de combinación, para administrarse por cualquier vía apropiada para la afección que se ha de 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 preferida puede variar con, por ejemplo, el estado del receptor.

Puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se coformulan (por ejemplo, en una forma de dosificación unitaria) y se administran o entregan simultáneamente en una formulación combinada; (2) se entregan de forma alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se administran en terapia alternada, puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se entregan secuencialmente, por ejemplo, en comprimidos, píldoras o cápsulas separadas o mediante inyecciones diferentes en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra una dosificación eficaz de cada principio activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas.

La coadministración de un Compuesto de Combinación con uno o más Compuestos de Combinación se refiere en

general a la administración simultánea o secuencial de uno o más Compuestos de Combinación, de manera que las cantidades terapéuticamente eficaces de los dos o más Compuestos de Combinación estén presentes en el cuerpo del paciente. En algunos casos, los Compuestos de Combinación (por ejemplo, dos, tres o cuatro Compuestos de Combinación) se coformularán para permitir la administración al mismo tiempo. En algunos casos, los Compuestos de Combinación coformulados pueden administrarse conjuntamente con uno o más Compuestos de Combinación adicionales.

La coadministración también incluye la administración de dosificaciones unitarias de los Compuestos de Combinación antes o después de la administración de dosificaciones unitarias de uno o más de otros principios activos, por ejemplo, la administración de los dos o más Compuestos de Combinación en segundos, minutos u horas después de la administración de uno o más de otros principios activos. Por ejemplo, puede administrarse en primer lugar una dosis unitaria de un Compuesto de Combinación, seguida en segundos o minutos de la administración de una dosis unitaria de un segundo Compuesto de Combinación, seguido en segundos o minutos de la administración de una dosis unitaria de uno o más de otros principios activos. Como alternativa, puede administrarse en primer lugar una dosis unitaria de uno o más de otros principios activos, seguida en segundos o minutos de la administración de una dosis unitaria de un Compuesto de Combinación, seguida en segundos o minutos de la administración de una dosis unitaria de un segundo Compuesto de Combinación. En algunos casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de un Compuesto de Combinación en primer lugar, seguida, después de un periodo de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de un segundo Compuesto de Combinación, seguida, después de un periodo de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de uno o más de otros principios activos. En otros casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de uno o más de otros principios activos en primer lugar, seguida, después de un periodo de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de un Compuesto de Combinación, seguida, después de un periodo de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de un segundo Compuesto de Combinación. Cuando se administran tres o más Compuestos de Combinación con uno o más principios activos adicionales, los Compuestos de Combinación puede administrarse uno tras otro en segundos, minutos u horas (por ejemplo, 1-12 horas) entre sí y el uno o más principios activos adicionales pueden administrarse antes, durante o después de la administración de los Compuestos de Combinación. Cuando se coformulan Compuestos de Combinación, éstos pueden administrarse simultáneamente o antes o después de la administración de uno o más principios activos adicionales.

A menos que se especifique lo contrario, la terapia de combinación puede administrarse como formas de dosificación separadas con cada principio activo, administradas juntas o por separado, secuencial o simultáneamente y cercanas en el tiempo o alejadas en el tiempo entre sí.

El curso de tratamiento puede prolongarse, por ejemplo, de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 48 semanas o más, por ejemplo, de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 24 semanas.

La presente invención incluye una combinación de componentes terapéuticamente eficaces para mejorar al menos un síntoma de infección por el VHC en un ser humano, incluyendo, pero no limitado a, náuseas, vómitos, pérdida de apetito, fatiga, ictericia, vómitos, diarrea, deshidratación, dolor abdominal, cirrosis del hígado. Además, en algunos individuos infectados por el VHC el uso de la terapia de combinación es eficaz para reducir la carga vírica de partículas víricas de VHC presentes en el cuerpo de la persona infectada en una cantidad estadísticamente significativa. La carga vírica puede medirse, por ejemplo, mediante la medición de los niveles plasmáticos de ARN de VHC usando, por ejemplo, el ensayo de VHC COBAS TaqMan (Roche Molecular Systems). Normalmente, una persona infectada por el VHC que se trata con los Compuestos de Combinación de acuerdo con la presente invención experimenta una mejora en uno o todos los síntomas asociados a la infección por el VHC.

#### Combinaciones de los dos o más Compuestos de Combinación con Ribavirina, pero no con Interferón

Como se ha analizado anteriormente, algunos tratamientos actuales contra el VHC incluyen la administración de interferón, pero este tratamiento normalmente produce efectos secundarios no deseados. Por tanto, sería deseable encontrar tratamientos eficaces contra el VHC que no requieran la administración de interferón.

Un aspecto de la presente invención proporciona composiciones, usos y similares para el tratamiento del VHC que comprenden la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin la administración de uno o más interferones. Este aspecto de la invención puede ser particularmente útil, ya que permite el tratamiento eficaz del VHC sin los efectos secundarios asociados a la administración de uno o más interferones.

En una realización de la presente invención, la cantidad combinada de ribavirina y Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, opcionalmente con uno o más agentes adicionales, es eficaz para tratar la infección por el VHC.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para mejorar uno o más síntomas de la infección por el VHC en un ser humano, que comprende: la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o

5 sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin la administración simultánea de uno o más interferones. En este sentido, la presente invención no excluye la posibilidad de la dosificación de uno o más interferones. Más bien, la presente invención puede usarse junto con otra terapia que, de hecho, incluye uno o más interferones. Un aspecto de la presente invención incluye el tratamiento eficaz del VHC con ribavirina sin la necesidad de uno o más interferones.

10 Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para reducir la carga vírica en un ser humano diagnosticado con VHC que comprende: la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, pero no uno o más interferones.

15 Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para el tratamiento del VHC en un sujeto humano que consiste esencialmente en la administración de ribavirina en combinación con los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para reducir la aparición de cuasiespecies del VHC con resistencia a los agentes antivíricos orales coadministrados que comprende: administrar los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin la administración simultánea de uno o más interferones.

25 De forma similar, otro aspecto de la presente invención incluye una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica para mejorar uno o más síntomas de la infección por el VHC en un ser humano que comprende los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye una composición para reducir la carga vírica en un ser humano diagnosticado con el VHC que comprende los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, pero no uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye una composición para el tratamiento del VHC en un sujeto humano que consiste esencialmente en ribavirina junto con los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otro aspecto de la presente invención incluye una composición para la terapia del VHC a base de ribavirina que comprende los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a condición de que dicha composición no incluya uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye una composición para reducir la aparición de cuasiespecies de VHC con resistencia a los agentes antivíricos orales coadministrados que comprende los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin uno o más interferones.

35 De forma similar, otro aspecto de la presente invención incluye el uso de: los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin uno o más interferones, en la fabricación de un medicamento para mejorar uno o más síntomas de la infección por el VHC en un ser humano; así como el uso de: los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, pero no uno o más interferones, en la fabricación de un medicamento para reducir la carga vírica en un ser humano diagnosticado con el VHC; así como el uso de ribavirina en combinación con los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del VHC en un sujeto humano, en el que dicho uso no incluye el uso de uno o más interferones; así como el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la fabricación de un medicamento para la terapia del VHC a base de ribavirina, en el que dicho uso evita la administración de uno o más interferones; así como el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, sin uno o más interferones en la fabricación de un medicamento para reducir la aparición de cuasiespecies de VHC con resistencia a agentes antivíricos orales coadministrados.

50 Otro aspecto de la presente invención incluye una combinación que comprende ribavirina y los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, combinación que está sustancialmente libre de uno o más interferones. En una realización, la combinación puede producirse como formas de dosificación separadas con cada principio activo, administradas juntas o por separado, secuencial o simultáneamente y cercanas en el tiempo o alejadas en el tiempo entre sí.

55 Otro aspecto de la presente invención incluye un kit que comprende: ribavirina, los dos o más Compuestos de Combinación y las instrucciones con respecto a una pauta de tratamiento para tratar, reducir la carga vírica o retrasar la aparición o progresión del VHC en el que la pauta de tratamiento incluye la administración de los dos o más Compuestos de Combinación y ribavirina sin la administración de uno o más interferones. En una realización, un kit de este tipo puede incluir también un envase, tal como un blíster. Como alternativa, un kit de este tipo puede proporcionar la prescripción y la dosificación individuales de cada componente como productos farmacéuticos envasados por separado, pero cuando se combina con las instrucciones con respecto a una pauta de tratamiento para tratar, reducir la carga vírica o retrasar la aparición o progresión del VHC, el mismo tiene por objeto estar dentro del alcance de la presente invención.

65 Otro aspecto de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende: ribavirina; los dos o

más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización, la composición farmacéutica puede ser una forma de dosificación unitaria.

5 A menos que se especifique lo contrario, la terapia de combinación con ribavirina puede administrarse como formas de dosificación separadas con cada principio activo administrado (incluyendo los Compuestos de Combinación), pueden administrarse juntas (por ejemplo, en forma de una dosificación unitaria, tal como un comprimido) o por separado, secuencialmente o simultáneamente, y cercanas en el tiempo o alejadas en el tiempo entre sí. Si se administran por separado, cada compuesto puede administrarse con el otro u otros al mismo tiempo o antes o  
10 después de dicha administración del otro u otros. Los principios activos pueden administrarse a diario. En una realización, una dosis diaria de los principios activos se administra en subdosis separadas, tales como una, dos, tres o cuatro veces al día. Ventajosamente, la dosificación diaria de los Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina puede administrarse una vez por día.

15 Aunque la presente invención incluye composiciones, usos y similares para el tratamiento del VHC que comprenden la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; y ribavirina, pero no uno o más interferones, la presente invención no excluye la posibilidad de la dosificación de uno o más interferones al ser humano. Más bien, la presente invención puede usarse junto con otra terapia para otra indicación que, de hecho, incluye uno o más interferones.

20 Combinaciones de los dos o más Compuestos de Combinación con Ribavirina e Interferón

Otro aspecto de la presente invención proporciona composiciones, usos y similares que comprenden la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y ribavirina, y uno o más interferones para el tratamiento del VHC. La administración de más interferón puede estar  
25 en relación temporal con la administración de los Compuestos de Combinación y ribavirina.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para mejorar uno o más síntomas de la infección por el VHC en un ser humano que comprende la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ribavirina y uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para reducir la carga vírica en un ser humano diagnosticado con VHC que comprende: la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con ribavirina y uno o más interferones.

30 Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método de terapia del VHC a base de ribavirina que comprende la administración de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con ribavirina y uno o más interferones.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso en un método para reducir la aparición de cuasiespecies de VHC con resistencia a agentes antivíricos orales coadministrados que comprende: administrar los dos o más  
40 Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con ribavirina y uno o más interferones.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ribavirina y uno o más interferones, en la fabricación de un medicamento para mejorar uno o más síntomas de la infección por el VHC en un ser humano. Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con ribavirina y uno o más interferones, en la fabricación de un medicamento para reducir la carga vírica en un ser humano diagnosticado con el VHC. Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de ribavirina en combinación con los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del VHC en un sujeto humano, en el que dicho uso incluye el uso de uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la fabricación de un medicamento para la terapia del VHC a base de ribavirina, en el que dicho uso incluye la  
50 administración de uno o más interferones. Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ribavirina y uno o más interferones en la fabricación de un medicamento para reducir la aparición de cuasiespecies de VHC con resistencia a agentes antivíricos orales coadministrados.

Otro aspecto de la presente invención incluye una combinación que comprende ribavirina y los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, combinación que incluye uno o más interferones.

Otro aspecto de la presente invención incluye un kit que comprende: ribavirina, los dos o más Compuestos de Combinación y uno o más interferones; e instrucciones con respecto a un régimen de tratamiento para tratar, reducir la carga vírica o retrasar la aparición o progresión del VHC en las que la pauta de tratamiento incluye la  
65

administración de los dos o más Compuestos de Combinación y ribavirina y la administración de uno o más interferones. En una realización, un kit de este tipo también puede incluir un envase, tal como un blíster. Como alternativa, un kit de este tipo puede proporcionar la prescripción y la dosificación individuales de cada componente como productos farmacéuticos envasados por separado, pero cuando se combina con las instrucciones con respecto a una pauta de tratamiento para tratar, reducir la carga vírica o retrasar la aparición o progresión del VHC, el mismo tiene por objeto estar dentro del alcance de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende: los dos o más Compuestos de Combinación o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ribavirina y uno o más interferones. En una realización, la composición farmacéutica puede ser una forma de dosificación unitaria.

A menos que se especifique lo contrario, la terapia de combinación con Ribavirina y uno o más interferones puede administrarse como formas de dosificación separadas con el uno o más interferones administrados al paciente y cada uno de los principios activos restantes que se han de emplear en la terapia de combinación (incluyendo los Compuestos de Combinación) se administran juntos (por ejemplo, en forma de una dosificación unitaria, tal como un comprimido) o por separado, secuencialmente o simultáneamente, y cercanas en el tiempo o alejadas en el tiempo entre sí. Si se administran por separado, cada compuesto puede administrarse con el otro u otros al mismo tiempo o antes o después de dicha administración del otro u otros. Los principios activos pueden administrarse a diario. En una realización, una dosis diaria de los principios activos se administra en subdosis separadas, tales como una, dos, tres o cuatro veces al día.

#### Terapia de combinación, incluyendo productos terapéuticos adicionales

En otra realización, los ejemplos no limitantes de combinaciones adecuadas incluyen las combinaciones de los dos o más Compuestos de Combinación con uno o más principios activos adicionales, incluyendo inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, inhibidores de la alfa-glucosidasa 1, hepatoprotectores, inhibidores nucleosídicos o nucleotídicos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B del VHC, inhibidores de la NS5A del VHC, agonistas de TLR-7, inhibidores de la ciclofilina, inhibidores del IRES del VHC, inhibidores de la entrada del VHC, inhibidores de la maduración del VHC, inhibidores del ensamblaje del VHC, inhibidores de la infectividad del VHC y potenciadores farmacocinéticos, así como otros fármacos para tratar el VHC. Más específicamente, los dos o más Compuestos de Combinación de la presente invención pueden combinarse con uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en:

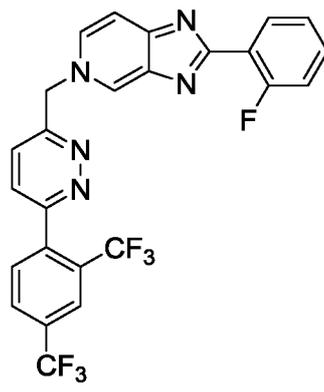
- (i) inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, por ejemplo, boceprevir (SCH-503034, SCH-7), telaprevir (VX 950), TMC-435 (IUPAC N-[(2R,3aR,10Z,11aS,12aR,14aR)-2-[2-(4-isopropiltiazol-2-il)-7-metoxi-8-metilquinolin-4-iloxi]-5-metil-4,14-dioxo-1,2,3,3a,4,5,6,7,8,9,11a,12,12a,13,14,14a-hexadecahidro[c]ciclopropa[g][1,6]diazacicotetradecin-12a-ilcarbonil]ciclopropanosulfonamida), ABT-450, ACH-1625, ACH-2684, BI-201 335, BI-1230, MK-5172, MK-7009, SCH-900518, VBY-376, VX-500, GS-9256, GS-9451, BMS-605339, PHX-1766, AS-101, YH-5258, YH-5530, YH-5531 y ITMN-191 (R-7227);
- (ii) inhibidores de la alfa-glucosidasa 1, por ejemplo, celgosivir (MX-3253), UT-231B, Miglitol;
- (iii) hepatoprotectores, por ejemplo, emericasán (IDN-6556), ME-3738, silibilina y MitoQ;
- (iv) inhibidores nucleosídicos o nucleotídicos de la polimerasa NS5B del VHC, por ejemplo, R1626, R7128 (R4048), IDX184, IDX-102, PSI-661, PSI-938, PSI-7851, PSI-7977, BCX-4678, valopicitabina (NM-283), MK-0608 y TMC649128;
- (v) inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B del VHC, por ejemplo, filibuvir (PF-868 554), ABT-333, ABT-072, BI-207 127, VCH-759, VCH-916, JTK-652, MK-3281, VBY-708, VCH-222, A848837, ANA-598, GL60667, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, VCH-796 (nesbuvir), GSK625433, BILN-1941 y XTL-2125;
- (vi) Inhibidores de la NS5A del VHC, por ejemplo, ACH-2928, AZD-2836 (A-831), AZD-7295 (A-689), BMS-766, BMS-790052, BMS-824393 y PPI-461;
- (vii) agonistas de TLR-7, por ejemplo, imiquimod, 852A, ANA-773, ANA-975, AZD-8848 (DSP-3025), PF-04878691 y SM-360320 y Compuesto 8;
- (viii) inhibidores de la ciclofilina, por ejemplo, DEB10-025, SCY-635 y NIM811;
- (ix) inhibidores del IRES del VHC, por ejemplo, MCI-067;
- (x) potenciadores farmacocinéticos, por ejemplo, roxitromicina, BAS-100, SPI-452, PF-4194477, TMC-41629;
- (xi) inhibidores de la entrada del VHC
- (xii) inhibidores del ensamblaje del VHC;
- (xiii) inhibidores de la maduración del VHC;
- (xiv) inhibidores de la infectividad del VHC; y
- (xv) otros fármacos para tratar el VHC, por ejemplo, timosina alfa 1 (Zadaxin), nitazoxanida (Alinea, NTZ), BIVN-401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilon (CPG-10101), KRN-7000, civacir, GI-5005, XTL-6865, BIT225, PTX-111, ITX2865, TT-033i, ANA 971, NOV-205, tarvacin, EHC-18, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, BMS-650032, BMS-791325, Bavituximab, MDX-1106 (ONO-4538), Oglufanida, FK-788 y VX-497 (merimepodib).

## EJEMPLOS DE SÍNTESIS

Se conocen en la bibliografía protocolos de síntesis para la preparación de los Compuestos 1, 2, 3, 6, 7 y 8. Adicionalmente, se proporciona un protocolo de síntesis para la preparación de cada uno de los Compuestos de Combinación en los Ejemplos a continuación.

Puede prepararse Compuesto 1 usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el documento US 7.754.720. También puede prepararse Compuesto 1 como se describe en el siguiente Ejemplo.

10 **Ejemplo 1: 5-((6-[2,4-bis(trifluorometil)fenil]piridazin-3-il)metil)-2-(2-fluorofenil)-5H-imidazo[4,5-c]piridina 1.**



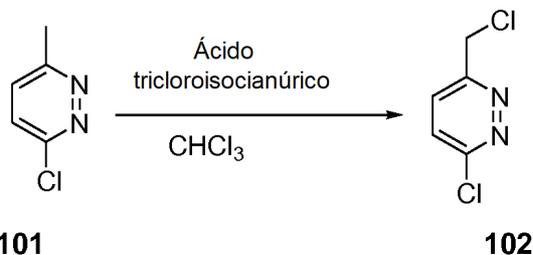
Compuesto	PM	Cantidad	Moles	Equivalentes
<b>104</b>	453,79	95 mg	0,209	1
DME	500 µl			
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 N ac.		313 ml	0,626	3
<b>105</b>	257,93	80,9 mg	0,313	1,5
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	1155	12 mg	0,0104	0,05

15 Se disolvió Compuesto **103** en dimetoxietano (DME). A esta solución se le añadió ácido 2,4-bis(trifluorometil)fenilborónico **105** y una solución acuosa 2 N de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A la mezcla bifásica resultante se le añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y después la reacción se calentó a 80 °C durante 72 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite y el Celite se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó en 6 g de SiO<sub>2</sub> usando MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para eluir el compuesto. El compuesto obtenido de este modo se contaminó con PPh<sub>3</sub>(O). El producto se volvió a purificar sobre una placa Chromatotron de 1 mm con MeOH del 0 al 5 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en etapas de un 1 %. Las fracciones puras se combinaron y se concentraron al vacío, después se secaron en alto vacío durante 12 horas. Se obtuvieron 11,8 mg de la base libre del compuesto 1 sin contaminación de PPh<sub>3</sub>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6,20 (s, 2), 7,32 (m, 3), 7,52 (m, 1), 7,78 (d, 1), 7,89 (d, 1), 7,95 (s, 2), 8,15 (m, 3), 8,35 (d, 1), 9,12 (s, 1); CL/EM M+H = 518.

25

El compuesto intermedio **104** se preparó como se indica a continuación.

a. Preparación de Compuesto **102**.

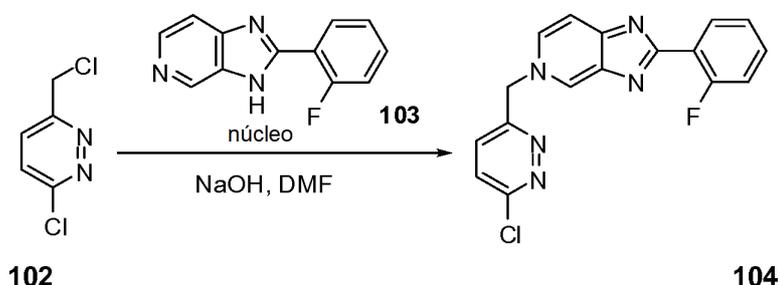


30

Compuesto	PM	Cantidad	mmoles	Equivalentes
<b>101</b>	128,56	5 g	38,9	1
TCCA	232,41	3,62 g	15,6	0,4
CHCl <sub>3</sub>		130 ml		

A una solución del material de partida disponible en el mercado **101** en  $\text{CHCl}_3$ , se le añadió ácido tricloroisocianúrico (TCCA) a  $60^\circ\text{C}$ . Después, la solución se agitó durante 1,5 h, se enfrió y se filtró con HiFlo-Celite. El filtrado se concentró y se secó con vacío. El rendimiento fue de 5,037 g de compuesto **102**.

5 b. Preparación de Compuesto **104**.



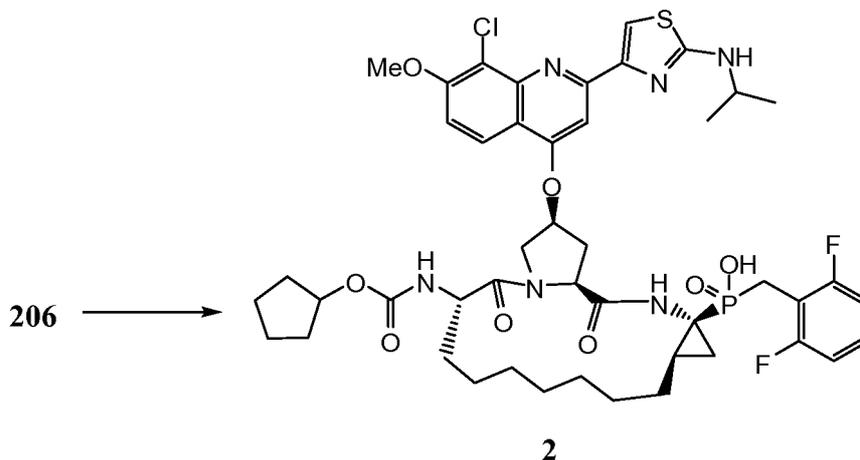
Compuesto	PM	Cantidad	mmoles	Equivalentes
<b>102</b>	163	5,073 g	31,12	1
<b>103</b>	213,2	6.635 g	31,12	1
NaOH (10 %)	40	1,245 g	31.12	1
DMF		320 ml		

10 A una solución de compuesto **103** en DMF (dimetilformamida), se le añadió NaOH. Se disolvió Compuesto **102** en DMF (20 ml) y se añadió a la solución lentamente. La reacción se agitó durante 3 horas, se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se retiró y el producto se recristalizó con diclorometano. El rendimiento fue de 5,7 g de compuesto **103**.

15 Puede prepararse Compuesto **2** usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el documento USSN 12/202319 (US 20100051763 A1). También puede prepararse Compuesto **2** como se describe en el siguiente Ejemplo.

**Ejemplo 2: Preparación de Compuesto 2.**

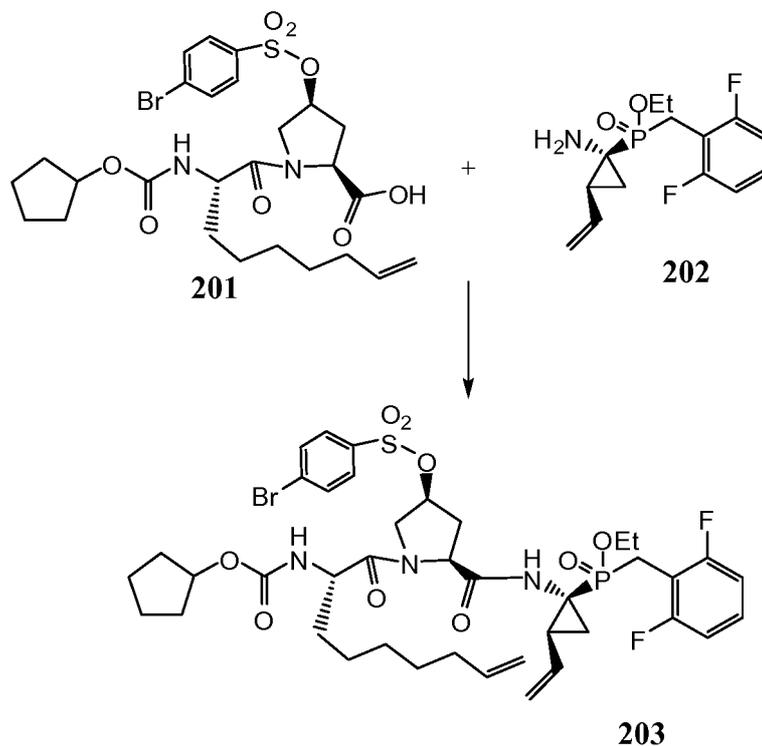
20



Se disolvió éster de fosinato **206** (23,7 g, 24,05 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (240 ml) y se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ . Se añadió yodotrimetilsilano (17,4 ml, 122,3 mmol) a un ritmo gota a gota rápido seguido de, después de 10 min, 2,6-lutidina (17,0 ml, 146,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h, después se enfrió de nuevo a  $0^\circ\text{C}$  y se añadió 2,6-lutidina (11,1 ml, 95,6 mmol) seguida de MeOH (24 ml). La solución se concentró en vacío y el residuo en bruto se purificó mediante HPLC para proporcionar 12,68 g del compuesto **2** en un rendimiento del 55 %.  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,35 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,64 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H), 7,35-7,22 (m, 1H), 7,02-6,89 (m, 2H), 5,85 (sa, 1H), 4,82-4,71 (m, 2H), 4,33 (sa, 1H), 4,28-3,99 (m, 3H), 4,16 (s, 3H), 3,57-3,28 (m, 2H), 2,90-2,78 (m, 1H), 2,63-2,50 (m, 1H), 2,08-1,91 (m, 1H), 1,91-1,70 (m, 2H), 1,70-1,13 (m, 22H), 1,37 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H);  $\text{RMN}^{31}\text{P}$  (121,4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  42,4; CLEM (M+1): 957,35 g.

Se preparó compuesto intermedio **206** como se indica a continuación.

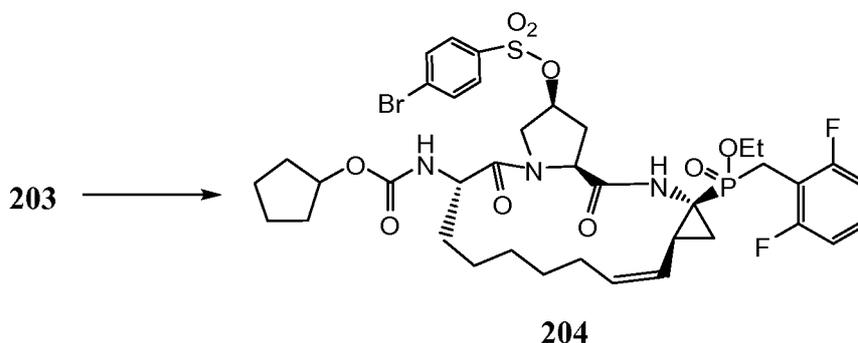
## a. Preparación de Compuesto 203.



- 5 Se disolvió Compuesto **201** (17,42 g, 28,30 mmol) en THF (136 ml) y se enfrió a 0 °C. A la solución se le añadió N-metilmorfolina (4,7 ml, 42,7 mmol). Después de 10 min a 0 °C, se añadió cloroformato de *i*-butilo (4,05 ml, 30,96 mmol) gota a gota. Después de 1 h adicional, se añadió éster etílico del ácido (1-amino-2-vinil-ciclopropil)-(2,6-difluoro-bencil)fosfínico **202** (8,94 g, 29,70 mmol) lentamente en forma de una solución en THF (20 ml). La suspensión se calentó a temperatura ambiente y después de 2 h se repartió entre H<sub>2</sub>O (400 ml) y acetato de etilo (200 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (200 ml, 2 veces) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl (1 N, 225 ml) y H<sub>2</sub>O (200 ml). El lavado con ácido y el lavado acuoso se combinaron y se volvieron a extraer con acetato de etilo (175 ml, 2 veces, 100 ml, 2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (400 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío proporcionando 25,06 g del dieno **203** en un rendimiento en bruto del 98,5 %. CLEM (M+1):898,06.

15

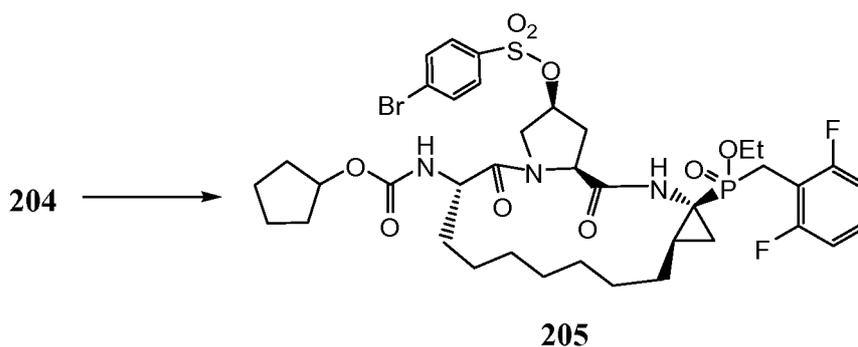
## b. Preparación de Compuesto 204.



- 20 Se disolvió compuesto **203** (12,91 g, 14,36 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,440 ml) y la solución se desgasificó durante 30 minutos. La solución se calentó a 40 °C y se añadió catalizador G1 de Grubb (2,95 g, 3,59 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 17 h después de lo cual se añadieron tris-hidroximetilfosfina (22,3 g, 18,0 mmol), TEA (50 ml, 35,9 mmol) y H<sub>2</sub>O (400 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 horas adicionales. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se separaron las dos capas. La capa orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (400 ml) y salmuera (300 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo en bruto se purificó mediante cromatografía de gel de sílice para proporcionar 8,30 g de olefina macrocíclica **204** en un rendimiento del 66 %. CLEM (M+1): 870,09.

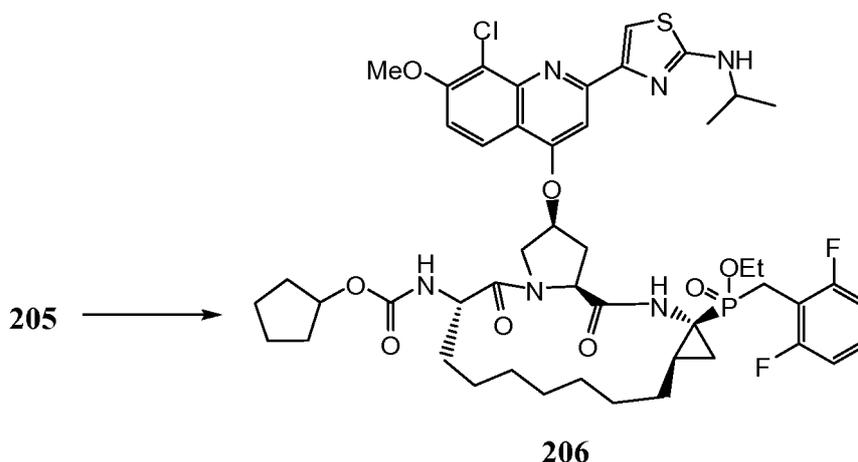
25

## c. Preparación de Compuesto 205.



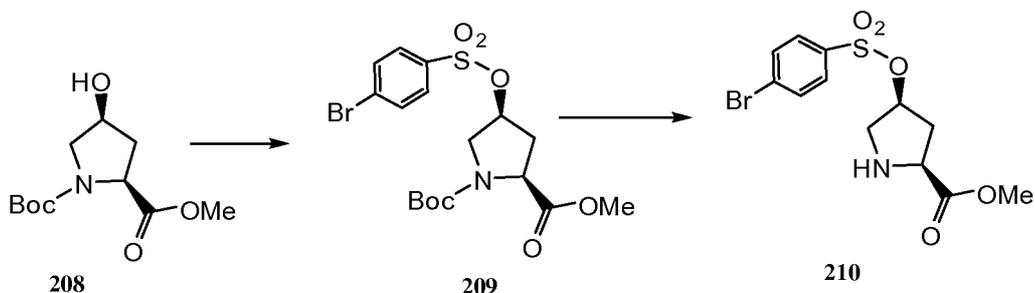
La olefina macrocíclica **204** (7,34 g, 8,42 mmol) se disolvió en acetato de etilo (105 ml) y se añadió rodio sobre alúmina (al 5 % en peso, 2,945 g, 0,40 % en peso). El sistema se evacuó y se lavó abundantemente con H<sub>2</sub> (1 atm (0,101 MPa), 3 veces). Al sistema, después de 3 h, se le añadió más rodio sobre alúmina (5 % en peso, 842 mg, 0,10 % en peso) y se evacuó y se purgó con H<sub>2</sub> (1 atm (0,101 MPa), 3 veces). Después de 1 h adicional la suspensión se filtró y se concentró al vacío proporcionando 6,49 g de macrociclo **205** reducido en un rendimiento en bruto del 88 %. CLEM (M+1): 872,04.

10 d. Preparación de Compuesto **206**.

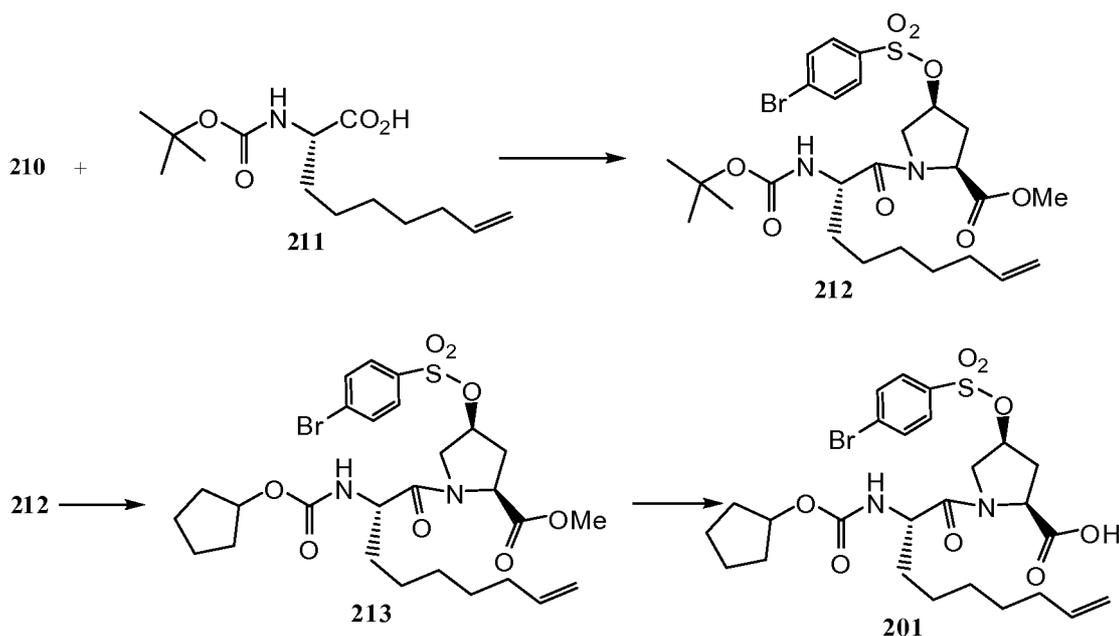


El macrociclo brosilato **205** (6,49 g, 7,67 mmol) se disolvió en N-metilpirrolidiona (25,0 ml) y se añadió 8-cloro-2-(2-isopropilamino-tiazol-4-il)-7-metoxi-quinolin-4-ol **207** (2,564 g, 7,33 mmol) seguido de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,40 g, 13,50 mmol). La mezcla se calentó a 65 °C durante 6 h, después se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con LiCl (5 %, 250 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml, 2 veces) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El residuo en bruto se purificó a través de cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo-metanol), proporcionando 4,39 g de aminotiazol **206** en un rendimiento del 58 %. CLEM (M+1): 985,28.

Puede prepararse Compuesto Intermedio 201 como se indica a continuación.



25

e. Preparación de Compuesto **209**.

5

Se disolvieron Compuesto **208** (7,00 g, 28,55 mmol) y DABCO (5,13 g, 45,94 mmol) en tolueno (30 ml). Se añadió una solución en tolueno (11 ml) de cloruro de brosilto (10,22 g, 40,01 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (210 ml) y se añadió HCl 0,5 N (200 ml). Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (200 ml, 2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida Combi-Flash para proporcionar 12,23 g de Compuesto **209** con un rendimiento del 92 %.

10

f. Preparación de los Compuestos **210** y **212**.

15

Se trató Compuesto **209** (12,2 g, 26,3 mmol) con HCl 4 N/1,4-dioxano (60 ml) y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró y se secó al vacío durante 20 minutos. La sal de HCl de amina en bruto del Compuesto **210** se disolvió en DMF (150 ml) y se añadió el ácido **211** (14,2 g, 52,6 mmol). Se añadieron HATU (20,0 g, 52,6 mmol) y NMM (13,5 g, 131,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (300 ml), se lavó con HCl 1 N (200 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida Combi-Flash para proporcionar 15,1 g del Compuesto **212** con un rendimiento del 93 %.

20

g. Preparación de Compuesto **213**.

25

A una solución de **212** (12,8 g, 20,7 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) se le añadió HCl 4 N en 1,4-dioxano (50 ml, 200 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se concentró, se secó al vacío durante 20 minutos y después se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (50 ml). Se añadió solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O (50 ml) y se agitaron durante 5 minutos. Se añadió cloroformiato de ciclopentilo recién preparado en THF (50 ml). La reacción se completó en 1 h. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se diluyó con EtOAc. La mezcla se llevó a pH = 2 con HCl 1 N y las dos capas se separaron. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron para proporcionar el Compuesto **213** en bruto (3,18 g).

30

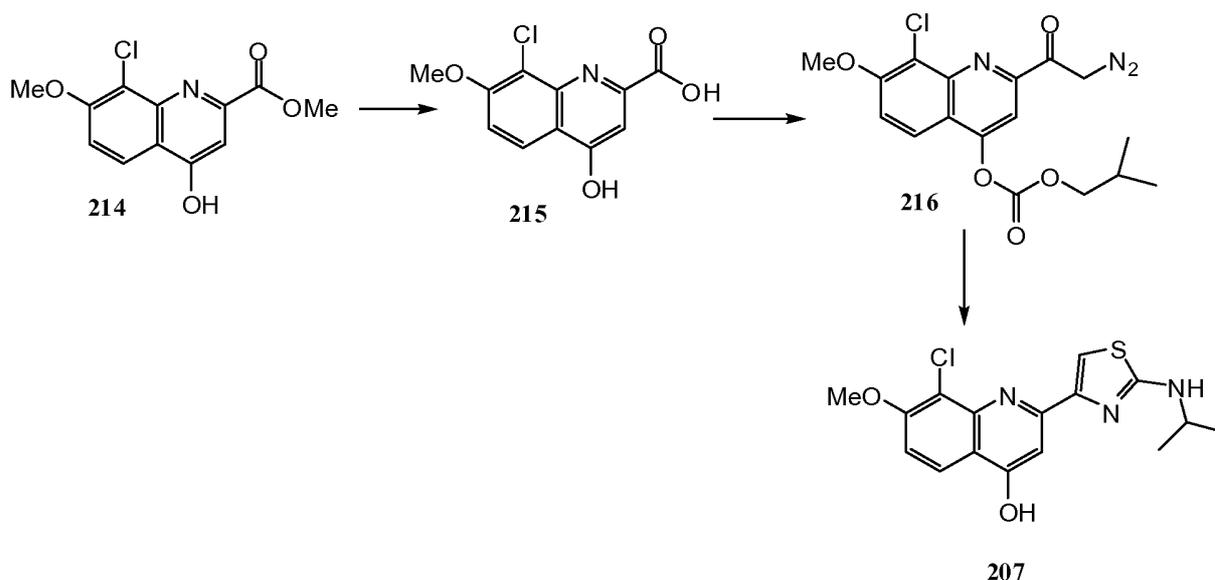
h. Preparación de Compuesto **201**.

35

El éster **213** en bruto (3,18 g, 5,07 mmol) se disolvió en THF (25 ml), H<sub>2</sub>O (25 ml) y después se añadió MeOH (6 ml) y LiOH (660 mg, 25,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se diluyó con EtOAc. La mezcla de reacción se acidificó a pH 2 con HCl 1 N y las dos capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se secaron al vacío para proporcionar 3,09 g de ácido **201**.

40

Puede prepararse intermedio 8-cloro-2-(2-isopropilamino-tiazol-4-il)-7-metoxi-quinolin-4-ol **207** como se indica a continuación.



i. Preparación de ácido 8-cloro-4-hidroxi-7-metoxiquinolona-2-carboxílico **215**.

- 5 A una solución de 8-cloro-4-hidroxi-7-metoxiquinolona-2-carboxilato de metilo **214** (36,5 g, 0,145 mol) en una mezcla de MeOH:THF 1:1 (160 ml en total) se le añadió una solución de LiOH (30,5 g, 0,725 mol) en H<sub>2</sub>O (80 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora cuando el análisis por CLEM mostró la conversión completa en el ácido carboxílico. La reacción se trató retirando los productos volátiles y ajustando el pH de la solución a 6 usando HCl 6 N acuoso. El residuo gomoso resultante se filtró y se secó en el liofilizador durante 2 días para proporcionar
- 10 34,4 g (99,6 %) del compuesto **215** en forma de un sólido de color blanco. EM IE (*m/z*) 253,9 [M+H].

j. Preparación de isobutil carbonato de 2-(2-diazo-1-oxo)-8-cloro-7-metoxiquinolín-4-ilo **216**.

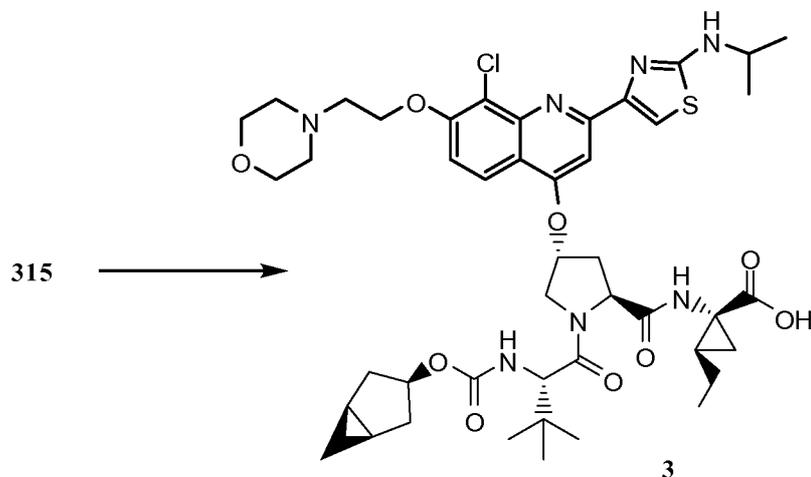
- 15 A una solución de ácido 8-cloro-4-hidroxi-7-metoxiquinolona-2-carboxílico **215** (10,2 g, 0,04 mol) en THF (400 ml) se le añadieron trietilamina (12,3 ml, 0,088 mol) y cloroformiato de *i*-butilo (11,6 ml, 0,088 mol) a 0 °C en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora cuando el análisis por CLEM demostró la finalización de la reacción para proporcionar el anhídrido mixto deseado. EM IE (*m/z*) 454,0 [M+H]. A la mezcla de reacción del anhídrido se le añadió una solución 1 M de diazometano (121 ml, 0,121 mol) en éter de dietilo a través de un embudo de plástico a 0 °C. Esta mezcla se dejó en agitación mientras se calentaba hasta temperatura ambiente
- 20 durante 2 horas adicionales. El análisis de la mezcla mediante CLEM demostró la finalización de la reacción. Se retiró el septo y la reacción se agitó durante 20 minutos adicionales antes de la retirada del disolvente. El residuo se secó adicionalmente a alto vacío para proporcionar el compuesto **216**, que se llevó a la siguiente etapa. EM IE (*m/z*) 377,9 [M+H].

25 k. Preparación de 8-cloro-2-(2-(isopropilamino)thiazol-4-il)-7-metoxiquinolín-4-ol **207**.

- A una solución enfriada de isobutil carbonato de 2-(2-diazo-1-oxo)-8-cloro-7-metoxiquinolín-4-il **216** (15,2 g, 0,040 mol) a 0 °C en THF (268 ml) se le añadió HBr al 48 % (23 ml, 0,201 mol) lentamente durante 15 minutos. La solución se agitó a 0 °C durante 40 minutos adicionales cuando el análisis por CLEM demostró la reacción completa.
- 30 La reacción se trató mediante la adición de NaOH acuoso 1 N (180 ml) a 0 °C para ajustar el pH de la capa acuosa a 9. Las capas se separaron y la capa acuosa se lavó con EtOAc (200 ml, 2 veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró al vacío para proporcionar 17,7 g de un sólido de color amarillo. EM IE (*m/z*) 431,9 [M+H].

- 35 La solución de la bromocetona obtenida a partir de la reacción anterior se suspendió en *i*-propanol (270 ml) e isopropilisourea (9,4 g, 0,080 mol). La mezcla de reacción se calentó a 72 °C durante 32 horas. El análisis por CLEM de la reacción demostró la conversión completa en el producto deseado. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente para permitir que el producto se separara por precipitación de la solución. La reacción se enfrió
- 40 adicionalmente a 0 °C durante 12 horas antes de la filtración. El filtrado se lavó con éter y se secó en un liofilizador para proporcionar 8,03 g de compuesto **207** en forma de un sólido de color naranja. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,21 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,92 (pentete, *J* = 6 Hz, 1H), 1,25 (d, *J* = 7 Hz, 6H); EM IE (*m/z*) 350,0 [M+H].

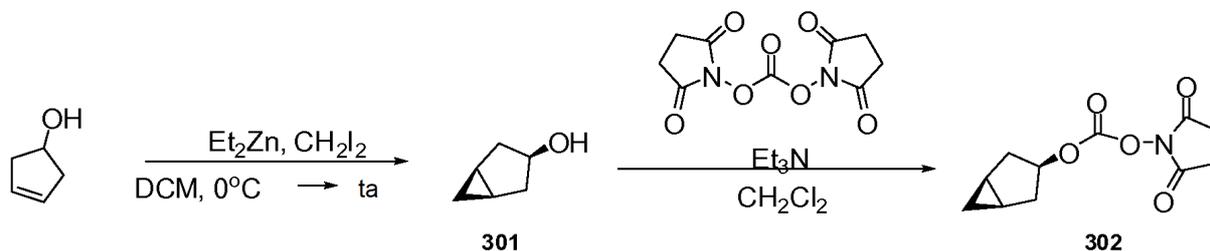
- 45 Puede prepararse Compuesto **3** usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el documento USSN 12/215.605 (US 20090257978 A1). También puede prepararse Compuesto **3** como se describe en el siguiente Ejemplo.

**Ejemplo 3: Preparación de Compuesto 3**

- 5 Se disolvió Compuesto **315** (12 g, 13 mmol) en THF (200 ml), se añadió LiOH (11 g, 260 mmol) en H<sub>2</sub>O (200 ml), seguido de MeOH (200 ml). La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 20 horas. Tras la finalización de la reacción, se añadió HCl 4 N en H<sub>2</sub>O para ajustar el pH a 7 a 0 °C. La mezcla se extrajo con EtOAc (400 ml, 2 veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío para proporcionar el Compuesto **3** en forma de un sólido de color amarillo (11 g, 93 %). CL/EM = 911,52 (M<sup>+</sup>+1).
- 10 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,95 (d, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,31 (d, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,37 (dd, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,83-3,56 (m, 7H), 3,50 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,45 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 1,62 (m, 2H), 1,50 (m, 1H), 1,33 (m, 2H), 1,18 (m, 1H), 1,05 (m, 8H), 0,90 (m, 3H), 0,76 (m, 11H), 0,14-0,04 (m, 2H).

El compuesto intermedio **315** se preparó como se indica a continuación.

15

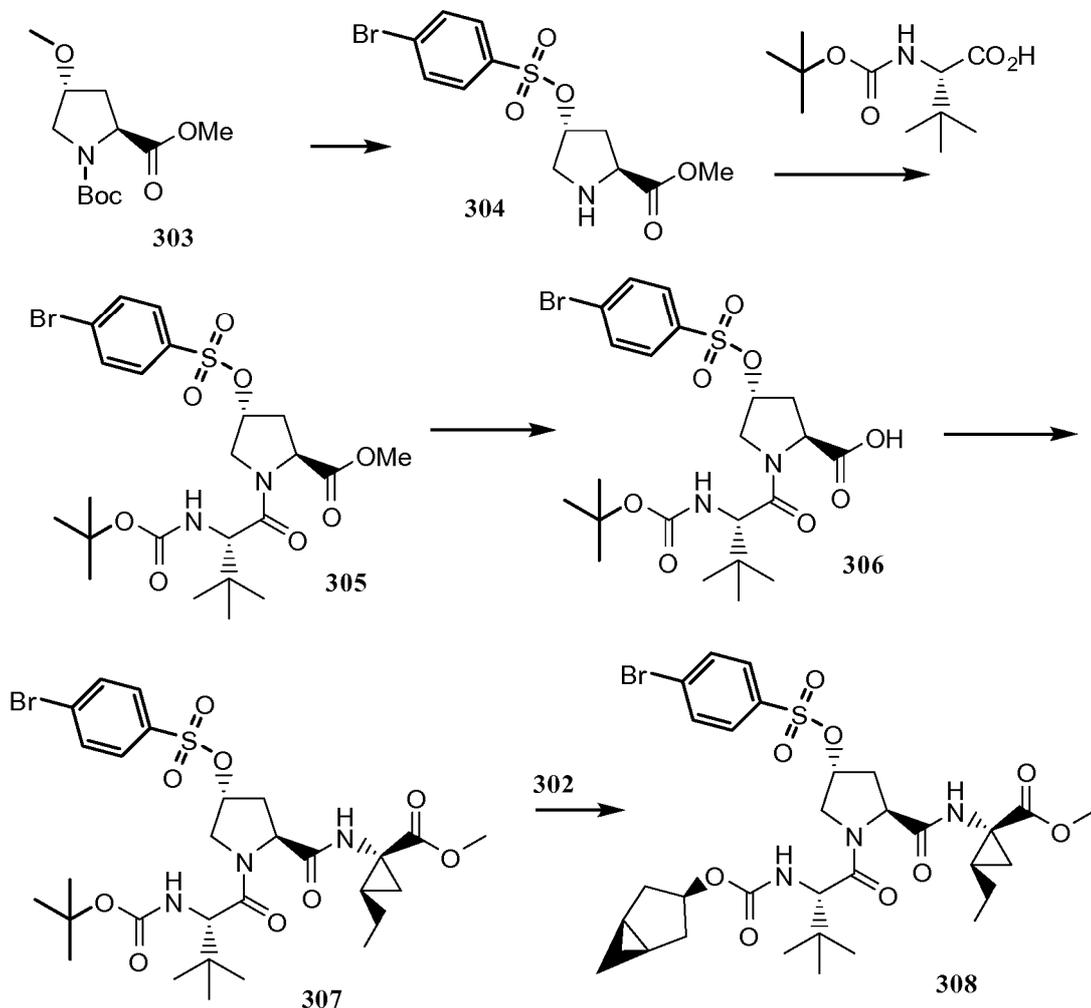
**a. Preparación de Compuesto 301.**

- 20 A un matraz de fondo redondo de tres bocas, purgado con argón, seco (1000 ml), se le añadieron diclorometano anhidro (100 ml) y Et<sub>2</sub>Zn (28 ml, 273 mmol) a 0 °C. (PRECAUCIÓN: La fuente de argón no puede ser de aguja. Use solamente un adaptador de vidrio apropiado. También puede adjuntarse al matraz un segundo burbujeador para evitar una acumulación de presión excesiva). Después se añadió ciclopenten-3-ol (10,0 ml, 119 mmol) gota a gota (se produjo gran cantidad de gas etano) al matraz y se dejó la mezcla de reacción en agitación hasta que cesó el desprendimiento de gas. Se añadió yodometano (22 ml, 242 mmol) gota a gota durante un periodo de 30 minutos.
- 25 La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó agitando durante la noche en un flujo de argón positivo, momento en el que el análisis por TLC indicó la desaparición completa del alcohol de partida. Después, la reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se inactivó con HCl 2 M (el precipitado de color blanco debe disolverse completamente). La mezcla bifásica se vertió en un embudo de separación y se recogió la capa orgánica. El disolvente se retiró a presión reducida hasta que quedaron 100 ml de material que contenía Compuesto **301**.
- 30

**b. Preparación de Compuesto 302.**

- 35 Se añadió diclorometano anhidro (525 ml) al matraz seguido de la adición gota a gota de trietilamina (34 ml, 245 mmol). La reacción continuó en agitación a temperatura ambiente en un flujo positivo de nitrógeno punto en el que se añadió carbonato de disuccinimidilo (40,7 g, 159 mmol) al matraz en porciones. La reacción se dejó en agitación hasta que el análisis por TLC indicó la desaparición completa del material de partida (2-3 días). Tras la finalización, la mezcla de reacción se inactivó con HCl 1 M (200 ml, 2 veces) y se lavó con H<sub>2</sub>O (200 ml, 2 veces). El material deseado se extrajo usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y las capas orgánicas combinadas se secaron usando MgSO<sub>4</sub> anhidro y se hicieron pasar a través de un tapón de sílice. El disolvente se retiró a presión reducida y el material en bruto se
- 40

purificó usando cromatografía ultrarrápida ( $f_R = 0,33$ , Hex/EtOAc 1:1) para proporcionar el compuesto **302** (22 g, 75 %): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,24 (t, 1H), 3,82 (s, 4H), 2,24 (m, 2H), 2,03 (d, 2H), 1,38 (m, 2H), 0,48 (m, 1H), 0,40 (m, 1H).



5

#### c. Preparación de Compuesto **304**.

10

Se disolvieron éster metílico de N-*t*-Boc-cis-4-hidroxi-L-prolina **303** (100,0 g, 407,7 mmol) y DABCO (1,5 eq, 68,6 g, 611,6 mmol) en tolueno anhidro (200 ml) en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l con un agitador mecánico y un embudo de adición. Después de enfriar la solución a 0 °C en atmósfera de  $\text{N}_2$ , se añadió una solución de cloruro de 4-bromo-bencenosulfonilo (1,3 eq, 135,6 g, 530,0 mmol) en 300 ml de tolueno a través de un embudo de adición durante 60 minutos. La mezcla de reacción se agitó y se calentó a temperatura ambiente durante la noche (16 horas). La mezcla se vertió lentamente en 2 l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M (ac.) y el producto se extrajo con EtOAc (2 l). Después de que la fase orgánica se lavara mediante HCl 0,5 N (2 l),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 l) y salmuera (1 l), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se concentró para proporcionar 195,45 g de un producto de brosilato oleoso de color amarillo.

15

20

A una solución del brosilato anterior (407,7 mmol) en diclorometano (300 ml) se le añadió lentamente HCl 4,0 M en dioxano (500 ml, 5 eq) y se dejó la solución resultante en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se añadió éter (500 ml) a la mezcla de reacción, la mezcla se agitó durante 15 minutos y se recogió el precipitado de color blanco por filtración. El sólido se lavó con éter y hexano y después se secó durante la noche al vacío para obtener 153,0 g de la sal de HCl de amina del compuesto **304**, 381,8 mmol, rendimiento del 94 % para dos etapas.

25

#### d. Preparación de Compuesto **305**.

30

A una solución de Boc-*tert*-butil-glicina (97,0 g, 420,0 mmol) en DMF (200 ml) y cloruro de metileno (200 ml) se le añadieron HATU (217,76 g, 572,7 mmol) y base de Hunig (126 ml, 1145,4 mmol) a temperatura ambiente. Después la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente, se añadió una solución de la sal de HCl anterior (153,0 g, 381,8 mmol) y base de Hunig (126 ml, 1145,4 mmol) en DMF (200 ml) y diclorometano (200 ml) a la mezcla

de ácidos anterior en una porción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, con control por CLEM. La mezcla de reacción se concentró para retirar el diclorometano a presión reducida y el sólido de color blanco que se formó se separó por filtración. La solución de DMF restante se diluyó con acetato de etilo (1 l), se lavó sucesivamente con LiCl al 3 % (aq) (3x650mL), solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (500 ml, 2 veces), HCl 0,5 N (ac) (600 ml, 2 veces), salmuera (500 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (500 ml, 3 veces) y salmuera (500 ml). La fracción orgánica resultante se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el compuesto **305** (111 g).

5

e. Preparación de Compuesto **306**.

10 A una solución del éster metílico **305** (120 g, 207,8 mmol) en THF (300 ml), MeOH (75 ml) se le añadió una solución de LiOH (26,18 g, 623,4 mmol) en H<sub>2</sub>O (150 ml). La solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se enfrió en un baño de hielo mientras se acidificaba con HCl 3 N a un pH de aproximadamente 5,5, se agitó durante 10 minutos y los sólidos blancos resultantes se recogieron por filtración. Los sólidos se lavaron con más agua, éter y hexano. Los sólidos se secaron al vacío a 40 °C durante la noche para proporcionar 95,78 g (82 %) del ácido **306**.

15

f. Preparación de Compuesto **307**.

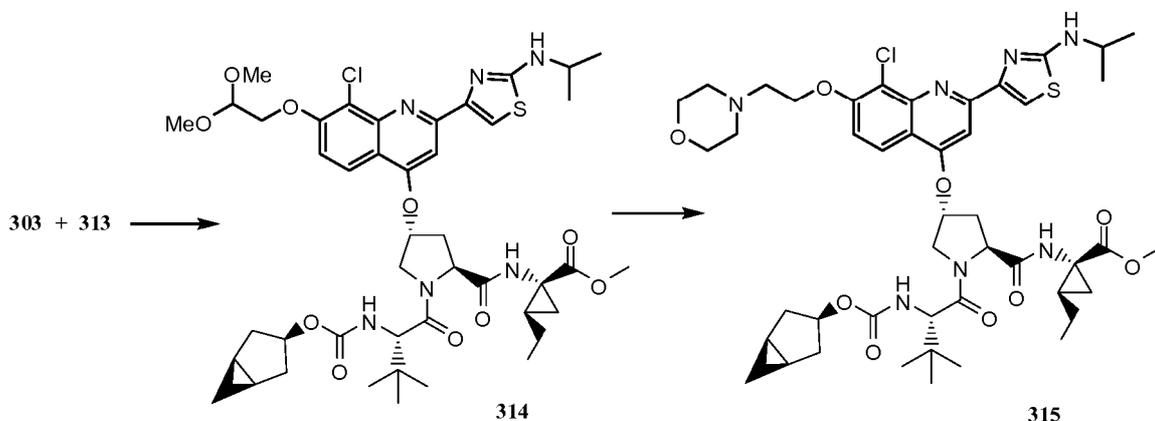
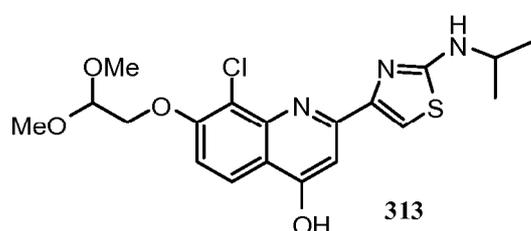
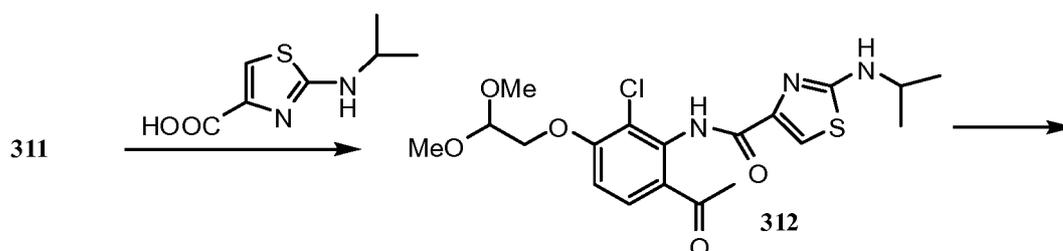
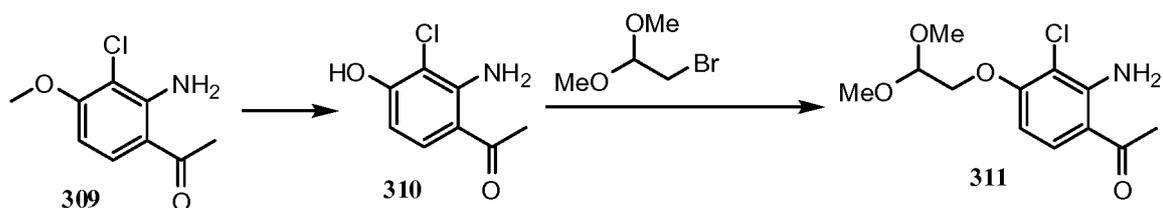
20 A una solución del ácido carboxílico **306** (81,4 g, 144,27 mmol) en DMF (200 ml) y diclorometano (200 ml) se le añadieron HATU (82,3 g, 216,4 mmol) y base de Hunig (47,5 ml, 432,8 mmol) a temperatura ambiente. Después, la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente, se añadió una solución de amina (158,7 mmol) y base de Hunig (47,5 ml, 1145,4 mmol) en DMF (200 ml) y diclorometano (200 ml) a la mezcla de ácido anterior en una porción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se controló por CLEM. Después la mezcla se concentró a presión reducida para retirar el diclorometano, los sólidos de color blanco que se formaron se separaron por filtración. La solución de DMF restante se diluyó con acetato de etilo (600 ml) y se lavó sucesivamente con LiCl 3 % (ac) (550 ml, 2 veces), solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (500 ml), HCl 1 N (ac) (500 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (500 ml) y salmuera (300 ml). La fracción orgánica resultante se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el compuesto **307** (111 g).

25

30 g. Preparación de Compuesto **308**.

Se disolvió Compuesto **307** en HCl 4 N en dioxano (300 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Después, se concentró al vacío y se coevaporó con diclorometano (200 ml, 2 veces) a sequedad. El residuo se disolvió en EtOAc (600 ml) y NaHCO<sub>3</sub> (1 l) saturado. Se agitó vigorosamente. Después de 10 minutos, se añadió éster biciclo[3.1.0]hex-3-ílico del éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ílico del ácido carbónico **302** (41,4 g, 173,1 mmol) en una porción. Después, la mezcla resultante se agitó durante otros 30 minutos, la capa orgánica se recogió y se lavó con salmuera (500 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexano para proporcionar 94,44 g (92 %) del compuesto **308**.

35



#### h. Preparación de Compuesto **310**.

- 5 Se agitó 1-(2-amino-3-cloro-4-hidroxi-fenil)-etanona **309** (70,7 g, 354 mmol) en HBr ac. al 48 % (500 ml) a 110 °C durante 72 horas. Después, la mezcla se enfrió a 0 °C con agitación, los sólidos se filtraron y lavaron con agua. Los sólidos resultantes se trituraron con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (-350 ml), se filtraron, se lavaron con agua y se secaron al vacío para proporcionar ~40 g (61 %) de **310** en bruto en forma de un sólido de color marrón oscuro. CL/EM = 186 (M<sup>+</sup>+1).

10

#### i. Preparación de Compuesto **311**.

- 15 Se disolvió 1-(2-amino-3-cloro-4-hidroxi-fenil)-etanona **310** (40 g, 215 mmol) en DMF (360 ml). Se añadió carbonato de cesio (140 g, 430 mmol), seguido de dimetil acetal de bromoacetaldehído (54,5 g, 323 mmol). Después, la mezcla se agitó vigorosamente a 65 °C durante 24 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron EtOAc (1 l) y H<sub>2</sub>O (1 l) a la mezcla. La capa orgánica se extrajo con EtOAc (400 ml, 1 vez). La capa orgánica combinada se lavó con solución acuosa de LiCl al 3 % (1 l, 2 veces), salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto **311** en forma de un sólido de color blanco (39 g, 67 %).

j. Preparación de Compuesto **312**.

A una mezcla de 1-[2-amino-3-cloro-4-(2,2-dimetoxi-etoxi)-fenil]-etanona **311** (13 g, 47,5 mmol) y bromhidrato del ácido isopropilaminotiazol-4-carboxílico (12,64 g, 47,5 mmol) en piridina (150 ml) se le añadió oxiclورو de fósforo (9,47 g, 61,8 mmol) lentamente a -40 °C. Después, la mezcla se agitó a 0 °C durante 4 horas. Tras la finalización de la reacción, se añadió H<sub>2</sub>O (30 ml) gota a gota a la mezcla. La mezcla se agitó después a 0 °C durante otros 15 minutos. La mezcla se concentró al vacío. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó con una solución acuosa sat. de NaHCO<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se añadieron hexanos lentamente a la solución y un sólido de color amarillo comenzó a precipitar. Se añadieron más hexanos hasta que no quedó demasiado producto en el líquido madre para proporcionar el compuesto **312** (18 g, 85 %).

k. Preparación de Compuesto **313**.

Se suspendió [6-acetil-2-cloro-3-(2,2-dimetoxi-etoxi)-fenil]-amida del ácido 2-isopropilamino-tiazol-4-carboxílico **312** (18 g, 40,7 mmol) en tolueno (400 ml). Se añadió NaH (2,4 g, 61 mmol) a la mezcla agitada vigorosamente mientras se controlaba el desprendimiento de H<sub>2</sub>. La mezcla se convirtió en una solución transparente durante el calentamiento a reflujo. La reacción se completó después de calentar a reflujo durante 3 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió una solución de AcOH (69,2 mmol) H<sub>2</sub>O (3 vol) a la mezcla. Después de la agitación vigorosa durante 1 hora a 0 °C, los sólidos se recogieron por filtración, se aclararon con H<sub>2</sub>O. La torta húmeda se secó a alto vacío a un peso constante para proporcionar el compuesto **313** (15 g, 86 %).

l. Preparación de Compuesto **314**.

A una mezcla de intermedio de brosilato **303** (15 g, 35 mmol) y compuesto **313** (27,5 g, 38,5 mmol) en NMP (200 ml) se le añadió carbonato de cesio (25,1 g, 77 mmol). La mezcla se agitó a 65 °C durante 5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron EtOAc (600 ml) y una solución acuosa de LiCl al 3 % (600 ml) a la mezcla. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de LiCl al 3 % (600 ml, 1 vez), salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el éster metílico deseado en forma de un sólido de color amarillo (23,6 g, 75 %). CL/EM = 900,13 (M<sup>+</sup>+1).

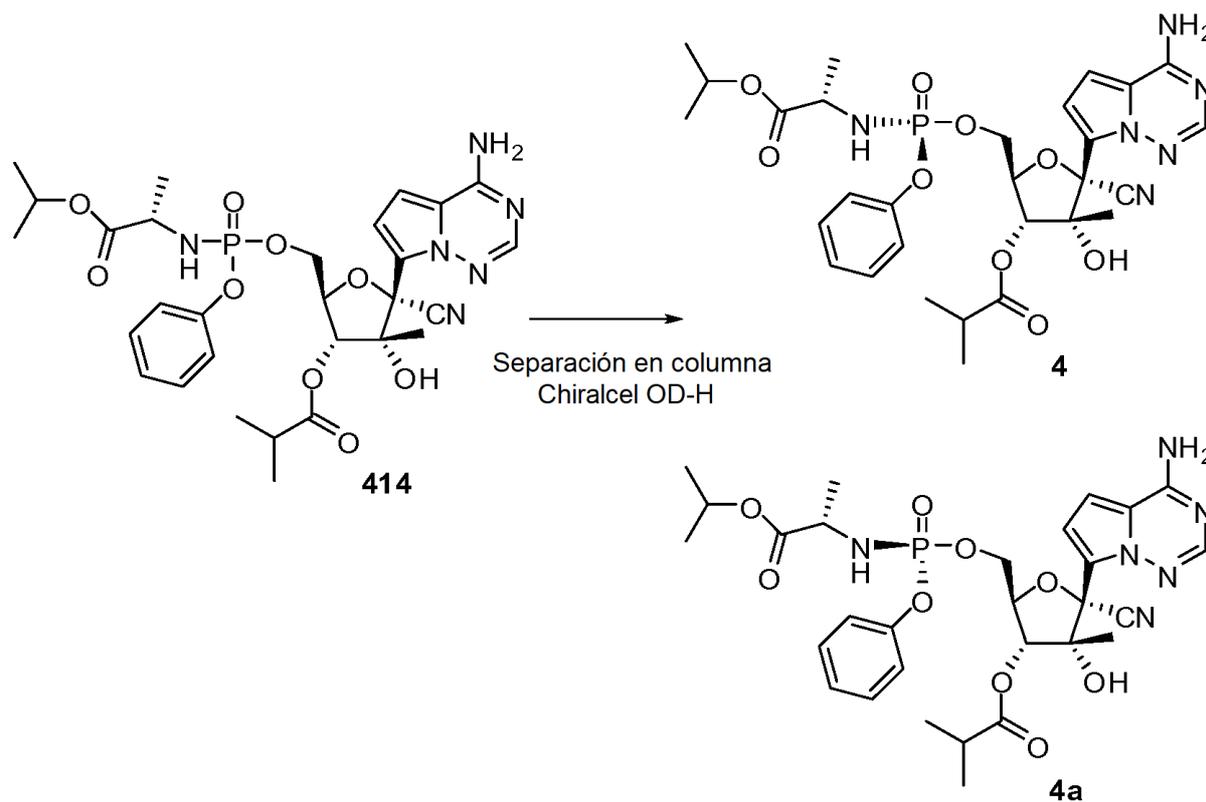
m. Preparación de Compuesto **315**.

Se disolvió éster metílico **314** (23,6 g, 26 mmol) en ácido acético glacial (200 ml), se añadió HCl 1,4 N en H<sub>2</sub>O (75 ml) a la solución. La mezcla se agitó a 60 °C durante 1 hora. Tras la finalización de la reacción, la mezcla se concentró para retirar los disolventes, se coevaporó con tolueno (2 veces) para retirar el ácido acético residual. Después, el residuo se disolvió en EtOAc (500 ml) y solución acuosa sat. de NaHCO<sub>3</sub> (suficiente para neutralizar la mezcla), mientras se controlaba el desprendimiento de CO<sub>2</sub>. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El residuo se secó adicionalmente a alto vacío durante 1 h y se usó tal cual para la siguiente etapa. El producto en bruto se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (360 ml), se añadieron morfina (3,4 g, 39 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (7,2 g, 34 mmol) a la mezcla a 0 °C. Después, se añadió ácido acético glacial (0,47 g, 7,8 mmol) gota a gota a la mezcla. La reacción se completó en 10 minutos a 0 °C. Se añadió una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> sat. para interrumpir la reacción. Después de agitar durante otros 20 minutos, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el producto de amina deseado **315** en forma de un sólido de color amarillo (12 g, 50 %). CL/EM = 924,63 (M<sup>+</sup>+1).

Puede prepararse Compuesto **4** como se describe en el siguiente Ejemplo.

**Ejemplo 4: Preparación de Compuesto 4.**

50



Se disolvió la mezcla diastereomérica **414** en heptano e isopropanol (70 %:30 %, 230 mg en 4,5 ml de los disolventes mezclados) y se sometió a separación en columna quiral en las siguientes condiciones:

5

Columna: Chiralcel OD-H, 2 x 25 cm  
 Sistema de disolventes: 70 % de heptano y 30 % de isopropanol  
 Caudal: 6 ml/min.  
 Volumen de carga por ejecución: 2,5 ml

10

El Compuesto **4** tuvo un tiempo de retención de 20 minutos. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,00 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,09 (sa, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,04 (m, 2H), 4,67 (c, 1H), 4,35-4,52 (m, 2H), 4,00 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,98 (s, 3H). RMN  $^{31}\text{P}$  (121,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,72 (s). El Compuesto **4** se recristalizó posteriormente en MTBE para producir cristales de calidad de rayos X.

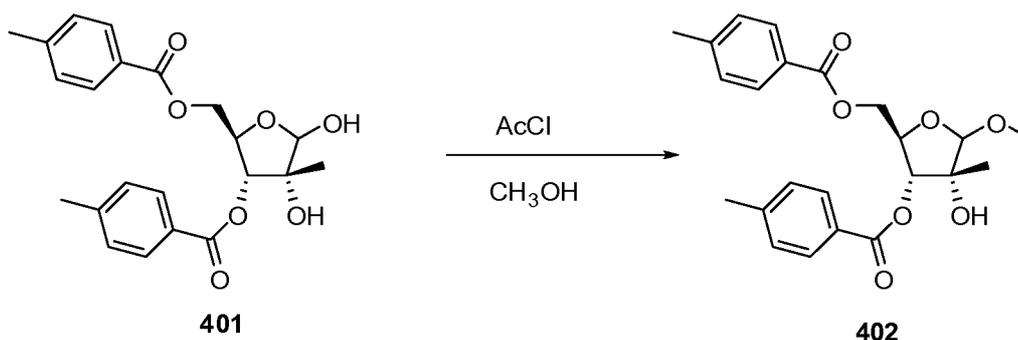
15

El Compuesto **4a** tuvo un tiempo de retención de 50 min. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,98 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,02 (sa, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,08 (d, 1H), 5,00 (m, 1H), 4,68 (c, 1H), 4,38-4,56 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,99 (s, 3H). RMN  $^{31}\text{P}$  (121,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,61 (s).

20

La mezcla diastereomérica de intermedios **414** se preparó como se indica a continuación.

a. Preparación de Compuesto **402**.



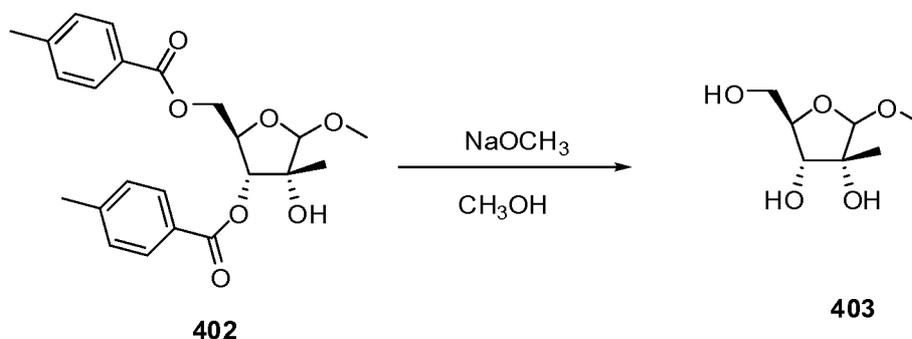
25

A una solución del compuesto **401** (22,0 g, 54,9 mmol, preparado de acuerdo con los procedimientos descritos en

J.O.C., 2004, 6257) en metanol (300 ml) se le añadió gota a gota cloruro de acetilo (22 ml) a 0 °C usando un embudo de goteo durante un periodo de 30 minutos y después se agitaron a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró, se volvió a disolver en acetato de etilo (400 ml), se lavó con NaOH 2 N enfriado en hielo y se concentró a sequedad, proporcionando el éter metílico en bruto **402** en forma de un aceite. EM = 437,2 (M + Na<sup>+</sup>).

5

b. Preparación de Compuesto **403**.

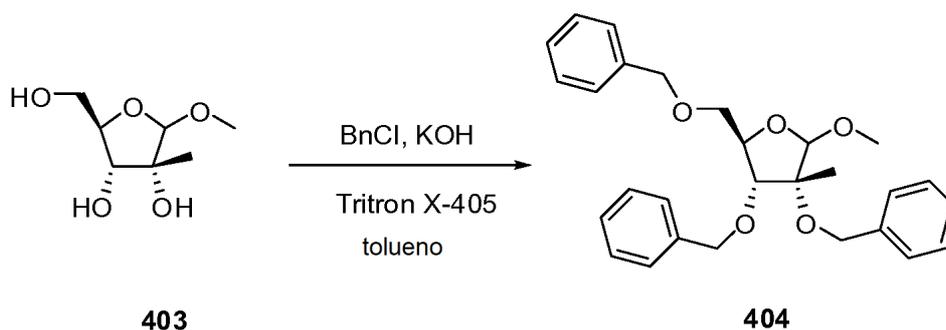


10

A una solución de compuesto **402** en metanol (300 ml) se le añadió una solución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol (20 ml, 10 mmol) y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con solución de HCl 4,0 N en dioxano (2,5 ml, 10 mmol). Después, la mezcla se concentró, proporcionando el compuesto **403** en bruto. EM = 201,0 (M + Na<sup>+</sup>).

15

c. Preparación de Compuesto **404**.

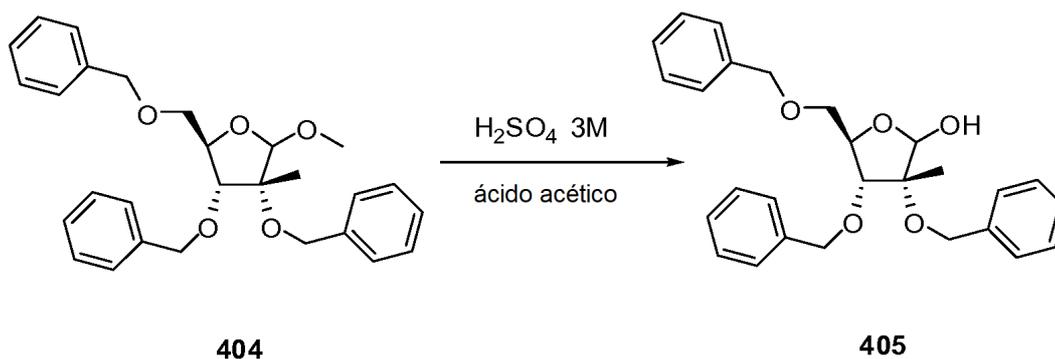


Una mezcla del compuesto **403**, Tritron X-405 (70 % en agua, 6,0 g), KOH al 50 % (en agua, 85 g) en tolueno (500 ml) se calentó a reflujo con una trampa de Dean-Stark unida. Después de 1 hora recogiendo 25 ml de agua, se añadió cloruro de bencilo (33 g, 260 mmol) y se continuó calentando a reflujo con agitación durante 16 horas. Después, la mezcla se enfrió y se repartió entre acetato de etilo (400 ml) y agua (300 ml). La capa orgánica se lavó con agua (300 ml) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc al 20 %/hexanos), proporcionando el metil éter **404** en forma de un aceite (22,0 g, 89 % en tres etapas). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,3 (m, 15H), 4,5-4,9 (m, 7H), 4,37 (m, 1H), 3,87 (d, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,52 (s, 3H), 1,40 (s, 3H).

25

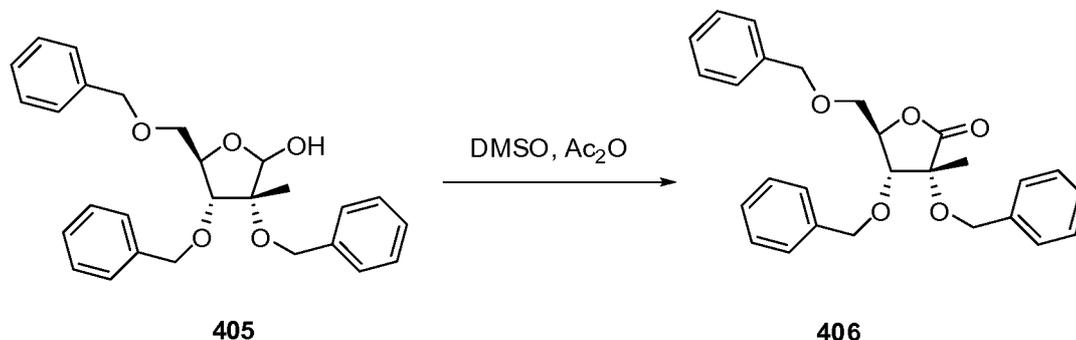
d. Preparación de Compuesto **405**.

30



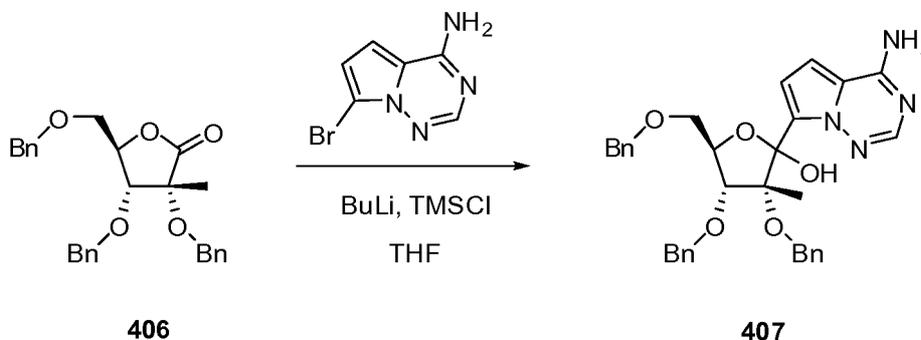
A una solución de **404** (22,0 g, 49,0 mmol) en ácido acético (110 ml) se le añadió ácido sulfúrico 3 M (preparado mezclando 4,8 g de ácido sulfúrico concentrado con 24 ml de agua) y se agitaron a 70 °C durante 8 horas. La mezcla se concentró a un volumen de 20 ml y se repartió entre acetato de etilo y NaOH 2 N enfriado con hielo. La capa de acetato de etilo se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc al -  
5 35%/hexanos), proporcionando el compuesto **405** en forma de un aceite (17,0 g, 80 %). EM = 457,2 (M + Na<sup>+</sup>).

e. Preparación de Compuesto **406**.



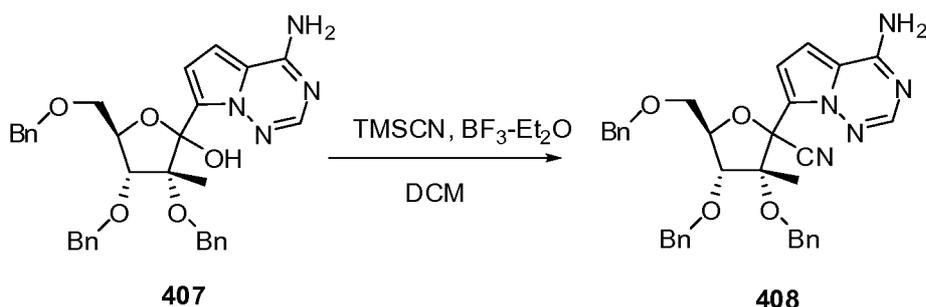
10 A una solución del compuesto **405** (45 g, 104 mmol) en DMSO (135 ml) se le añadió gota a gota anhídrido acético (90 ml, 815 mmol) a temperatura ambiente en argón. La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente y después se vertió en hielo-agua (1 l) mientras se agitaba. Después, el hielo se fundió por completo (30 minutos), se  
15 añadió acetato de etilo (500 ml). La capa orgánica se separó. Este proceso de extracción se repitió tres veces (500 ml, 3 veces). Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc al 20%/hexanos), proporcionando el compuesto **406** en forma de un aceite (39 g, 88 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,3 (m, 15H), 4,4-4,8 (m, 7H), 4,08 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,75 (dd, J = 2, 4, 11,4 Hz, 1H), 3,64 (dd, J = 5,4, 11,4 Hz, 1H), 1,51 (s, 3H).

20 f. Preparación de Compuesto **407**.



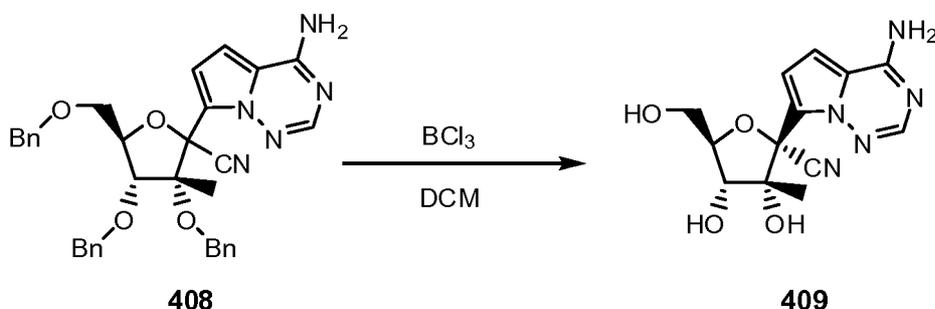
25 A un matraz de fondo redondo, purgado con argón, seco (100 ml), se le añadieron 7-bromo-pirrol[2,1-f][1,2,4]triazin-4-ilamina (234 mg, 1,10 mmol) (preparado de acuerdo con el documento WO2007056170) y THF anhidro (1,5 ml). Después, se añadió TMSCl (276 ml, 2,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. El matraz se colocó en un baño de hielo seco/acetona (-78 °C) y BuLi (2,5 ml, 4,0 mmol, 1,6 M en hexanos) gota a gota. Después de 1 hora, una solución de compuesto **406** (432,5 mg, 1,0 mmol) en THF se enfrió a 0 °C y después se añadió gota a gota al matraz de reacción. Después de 1 hora de agitación a -78 °C, el matraz se calentó a 0 °C y se añadió NH<sub>4</sub>Cl sat.  
30 (5 ml) para interrumpir la reacción. Los compuestos orgánicos se extrajeron usando EtOAc (10 ml, 3 veces) y las capas orgánicas combinadas se secaron usando MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró a presión reducida y el material en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (hexanos/EtOAc). Se aislaron 560 mg (90 %) del compuesto **407** en forma de una mezcla de dos anómeros. CL/EM = 567,2 (M + H<sup>+</sup>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,85 (m, 1H), 7,27 (m, 15H), 7,01 (m, 1H), 6,51 (m, 1H), 4,66 (m, 8H), 4,40 (m, 2H), 3,79 (m, 3H), 1,62 (s, 2'-CH<sub>3</sub> del anómero), 1,18 (s, 2'-CH<sub>3</sub> del anómero).  
35

g. Preparación de Compuesto **408**.



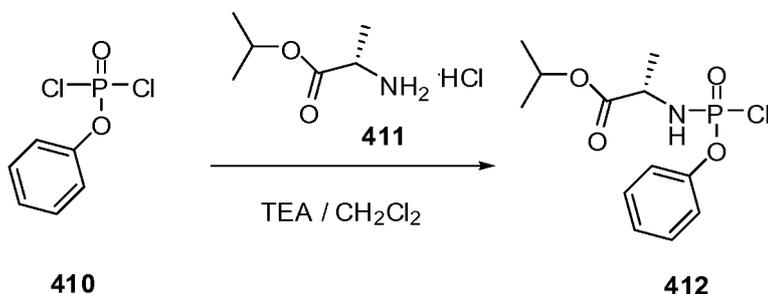
A una solución de Compuesto **407** (1 g, 1,77 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) a  $0^\circ\text{C}$  se le añadieron TMSCN (1,4 ml, 10,5 mmol) y  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  (1 ml, 8,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a  $0^\circ\text{C}$  durante 0,5 horas, después a temperatura ambiente durante 0,5 hora adicional. La reacción se inactivó con  $\text{NaHCO}_3$  a  $0^\circ\text{C}$  y se diluyó con  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$ . La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, se eluyó con  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$ -hexanos (1:1 a 2:1), para proporcionar el compuesto **408** (620 mg, 61 %) en forma de una mezcla de isómeros. EM = 576,1 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ).

10 h. Preparación de Compuesto **409**.

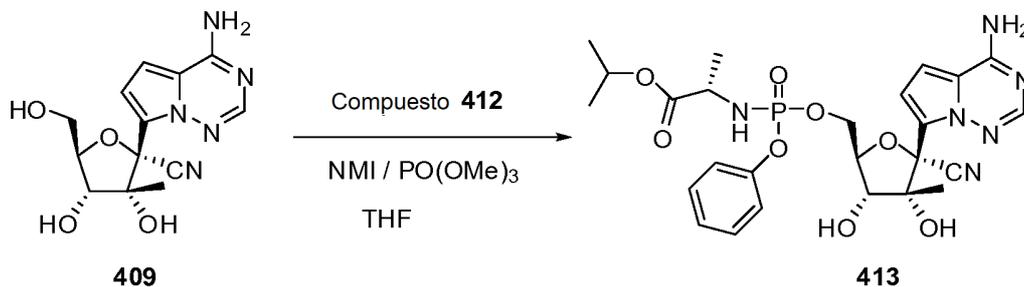


A una solución de compuesto **408** (150 mg, 0,26 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) a  $-78^\circ\text{C}$  se le añadió  $\text{BCl}_3$  (2 ml, 1 M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La mezcla de reacción se agitó a  $-78^\circ\text{C}$  durante 1 hora. La reacción se inactivó a  $-78^\circ\text{C}$  mediante la adición gota a gota de TEA (2 ml) y MeOH (5 ml). La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente, se evaporó y se coevaporó con MeOH varias veces. El residuo se trató con  $\text{NaHCO}_3$  (1 g en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ), se concentró y se purificó mediante HPLC para proporcionar el compuesto producto deseado **409** (48 mg, 60 %). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7,74 (s 1H), 6,76 (d,  $J = 5$  Hz, 1H), 6,73 (d,  $J = 5$  Hz, 1H), 4,1 (m, 1H), 3,9 (m, 1H), 3,8 (m, 2H), 0,84 (s, 3H). EM = 305,9 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ). También se obtuvo el otro anómero alfa (9 mg, 11 %): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7,70 (s 1H), 6,8 (d,  $J = 5$  Hz, 1H), 6,7 (d,  $J = 5$  Hz, 1H), 4,25 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 1,6 (s, 3H). EM = 306,1 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ).

25 i. Preparación de Compuesto **412**.



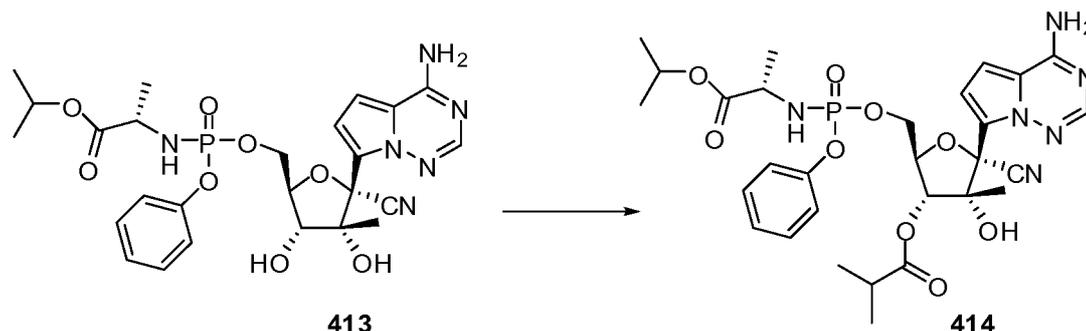
Se disolvió Compuesto **410** (disponible en el mercado, 4,99 g, 23,8 mmol) en diclorometano (100 ml) y se añadió clorhidrato de éster isopropílico de alanina **411** (3,98 g, 23,8 mmol). La solución transparente resultante se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$  durante 30 min. Se añadió trietilamina (6,63 ml, 47,5 mmol) gota a gota durante 15 minutos. Después, se dejó que la mezcla se calentara a temperatura ambiente. Después de 16 horas, el disolvente se retiró por corriente de argón. El residuo se volvió a disolver en MTBE (25 ml) y el producto insoluble se retiró por filtración en atmósfera de argón. El filtrado se condensó por corriente de argón y el producto en bruto **412** se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,1-7,4 (m, 5H), 5,1 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 1,5 (d, 3H), 1,2 (m, 6H). RMN  $^{31}\text{P}$  (121,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,8 y 8,4 (2s).

j. Preparación de Compuesto **413**.

5 A una solución de compuesto **409** (1,03 g, 3,37 mmol) en fosfato de trimetilo (2,0 ml) y THF (20 ml) se le añadió *N*-metilimidazol (1,5 g, 18,3 mmol) a 0 °C. Una solución del compuesto **412** (2,5 g, 8,18 mmol) en THF (3 ml) se añadió gota a gota. Se dejó que la mezcla resultante se calentara a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa de acetato de etilo se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo a etanol al 10 %/acetato de etilo), proporcionando 1,15 g  
 10 (59 %) del compuesto **413** en forma de una mezcla diastereomérica 1:1 en fósforo. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,02 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H), 6,8 (2d, 1H), 6,7 (2d, 1H), 6,08 (s, 2H), 5,03 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 3,9-4,1 (m, 3H), 1,31 (d, 3H), 1,2 (m, 6H), 0,83 (s, 3H). RMN <sup>31</sup>P (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,78 (s). EM = 575,1 (M + H<sup>+</sup>).

k. Preparación de Compuesto **414**.

15



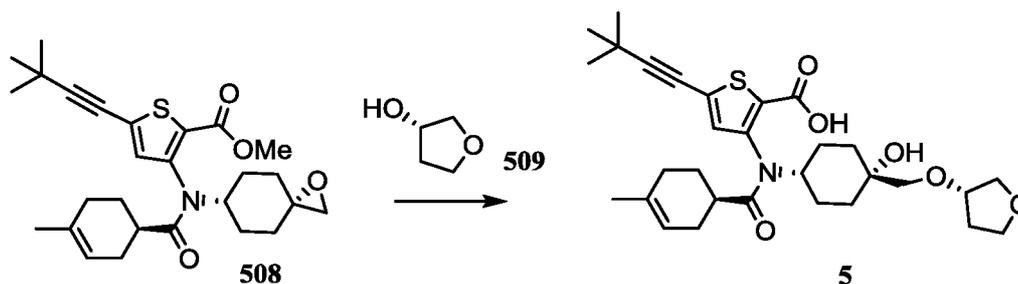
A una solución de compuesto **413** (175 mg, 0,305 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se le añadió dimetil acetal de *N,N*-dimetilformamida (41 µl, 0,34 mmol, 1,1 eq.) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción estaba completa (por CLEM). Después, la mezcla se concentró a sequedad. Al residuo se le añadieron DCC (250 mg, 1,21 mmol, 4 eq.), acetonitrilo (5 ml) y ácido isobutírico (55 mg, 58 µl, 2 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadieron agua (0,2 ml) y ácido trifluoroacético (0,1 ml) a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 64 horas. Se añadió bicarbonato de sodio (500 mg) a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (metanol al 5 %/diclorometano), proporcionando 144 mg (73 %) del compuesto **414** en forma de mezcla diastereomérica 1:1 en fósforo. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,00 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,71 (2d, 1H), 5,97 (sa, 2H), 5,94 (d, 1H), 5,07 (2d, 1H), 5,01 (m, 1H), 4,68 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,4 (2d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,98 y 0,99 (2s, 3H). RMN <sup>31</sup>P (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,56 y 2,65 (2s). EM = 645,1 (M + H<sup>+</sup>).

30

Puede prepararse Compuesto **5** como se describe en el siguiente Ejemplo.

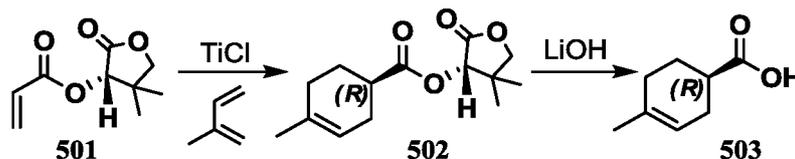
**Ejemplo 5: Preparación de 5: ácido 5-(3,3-dimetilbut-1-in-1-il)-3-[[*cis*-4-hidroxi-4-[[*(3S)*-tetrahidrofuran-3-iloxi]metil]ciclohexil]][(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]carbonil]amino]tiofeno-2-carboxílico **5**.**

35



Se trataron éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarboxilato]-(1-oxa-espiro[2.5]oct-6-il)-amino]-tiofeno-2-carboxílico **508** (132 mg, 0,28 mmol) y (S)-tetrahidro-furan-3-ol **509** (247 mg, 2,8 mmol) en 1-metil-pirrolidin-2-ona (3 ml) con *tert*-butóxido de potasio (251 mg, 2,24 mmol), se cerraron herméticamente y calentaron a 40 °C durante 16 horas. Después de enfriar la mezcla se trató con HCl 2 M hasta pH 3, se repartió entre acetato de etilo y agua y se separó. La capa orgánica se lavó con solución de cloruro de litio al 5 %, agua, salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtrar y purificar el residuo se purificó mediante HPLC con CH<sub>3</sub>CN (TFA al 0,1 %)/H<sub>2</sub>O (TFA al 0,1 %) para proporcionar 107 mg (rendimiento del 70 %) de compuesto **5** en forma de un polvo de color blanco: EM (m/z): 544,0 [M+H]<sup>+</sup>; tiempo de retención de HPLC 4,22 min (acetonitrilo al 2-98 %:agua con ácido trifluoroacético al 0,05 %).

El compuesto intermedio **508** se preparó como se indica a continuación.



15 a. Preparación de Compuesto **502**.

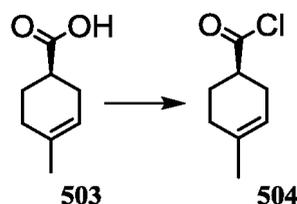
Se enfriaron (S)-3-hidroxi-4,4-dimetildihidrofuran-2(3H)-ona (2,60 g, 20 mmol) y diisopropiletilamina (5,2 ml, 30 mmol) en diclorometano (25 ml) a -10 °C y se trataron gota a gota con cloruro de acrililo (2,03 ml, 25 mmol) y se agitaron durante 2 h. Se añadió HCl 1 M (20 ml) y la capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 10-40 %, hexanos) proporcionó 2,09 g (rendimiento del 57 %) del acrilato de (S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-ilo deseado **501** en forma de un aceite transparente.

Se enfrió acrilato de (S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-ilo **501** (2,05 g, 11,1 mmol) en diclorometano (17,5 ml) y hexanos (2,5 ml) a -10 °C y se trataron con tetracloruro de titanio (2,2 ml, 1 M en diclorometano, 2,2 mmol). La solución de color amarillo se agitó durante 15 minutos y se trató con isopreno (1,67 ml, 16,7 mmol) gota a gota durante 5 minutos. Después de agitar durante 2 horas, se añadió una porción adicional de isopreno (1,67 ml, 16,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a -10 a 0 °C durante 3,5 horas. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio (sat. ac.). Se añadieron agua y acetato de etilo:hexanos (1:1). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo:hexanos (1:1). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 10-50 %:Hex, columna de 80 g) para proporcionar 1,30 g (rendimiento del 46 %) de 4-metilciclohex-3-enocarboxilato de (R)-((S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-ilo) **502** en forma de un aceite transparente.

35 b. Preparación de Compuesto **503**.

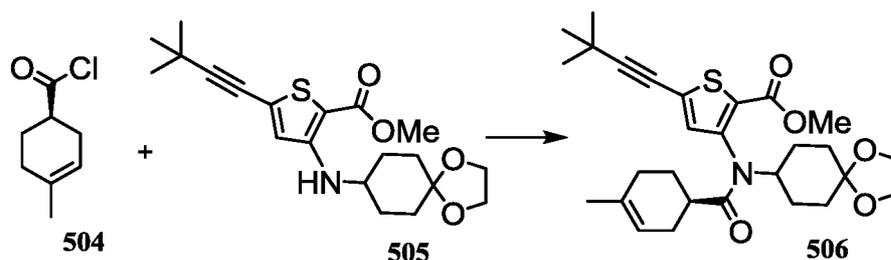
Se trataron 4-metilciclohex-3-enocarboxilato de (R)-((S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-ilo) **502** (1,30 g, 5,15 mmol) en THF (10 ml), agua (1 ml) y metanol (1 ml) con monohidrato de hidróxido de litio (2,16 g, 51,5 mmol) y se calentaron a 50 °C con agitación. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se trató con HCl 1 M. La mezcla se extrajo con hexanos:THF (10:1), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a 0,738 g (rendimiento cuantitativo) de ácido (R)-4-metilciclohex-3-enocarboxílico **503** en forma de un polvo blanco.

c. Preparación de Compuesto **504**.



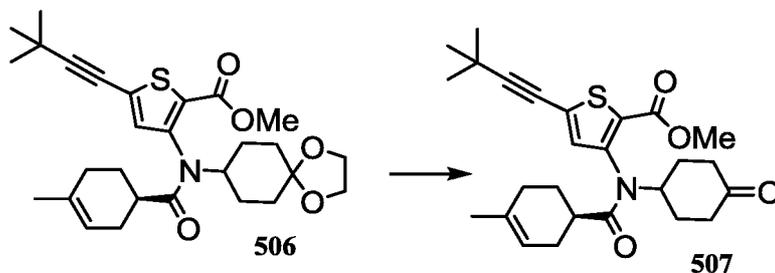
Se trató ácido (R)-4-metilciclohex-3-enocarboxílico **503** (371 mg, 2,65 mmol), secado azeotrópicamente mediante evaporación a partir de tolueno, con fosfato de potasio tribásico (1,13 g, 7,94 mmol), se suspendieron en diclorometano (7,6 ml) y se trataron con dimetilformamida (4 gotas). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató gota a gota con cloruro de oxalilo (0,75 ml, 7,9 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 horas. Después de filtrar los sólidos, la solución se concentró, se trató con hexanos y se concentró de nuevo para proporcionar cloruro de (R)-4-metilciclohex-3-enocarboxilato **504** en forma de un aceite de color amarillo claro que se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

55 d. Preparación de Compuesto **506**.



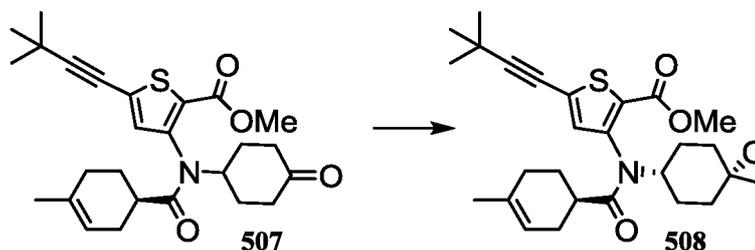
Se suspendieron cloruro de (R)-4-metilciclohex-3-enocarbonilo **504** (2,65 mmol), éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-(1,4-dioxa-espiro[4.5]dec-8-il-amino)-tiofeno-2-carboxílico **505** (250 mg, 0,66 mmol) y fosfato de potasio tribásico (562 mg, 2,65 mmol), en dicloroetano (1,7 ml), se cerraron herméticamente con un tapón y se calentaron a 90 °C. Después de 16 horas, la mezcla de reacción se enfrió y se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. La cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 10-40 %:hexanos) proporcionó 220 mg (rendimiento del 67 %) del éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarbonil]-amino]-tiofeno-2-carboxilato **506** deseado en forma de una espuma de color beige.

e. Preparación de Compuesto **507**.



Se disolvió éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarbonil]-amino]-tiofeno-2-carboxilato **506** (219 mg, 0,438 mmol) en THF (3,5 ml) y se trataron con HCl 4 M (1,75 ml, 7,01 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 45 °C y se agitó 2 h. Se añadió acetato de etilo y la capa orgánica se separó, después se lavó con agua, bicarbonato de sodio (sat. ac.), agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a 0,190 g (rendimiento del 95 %) del éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarbonil]-amino]-tiofeno-2-carboxílico deseado **507** en forma de una espuma de color blanco.

f. Preparación de Compuesto **508**.

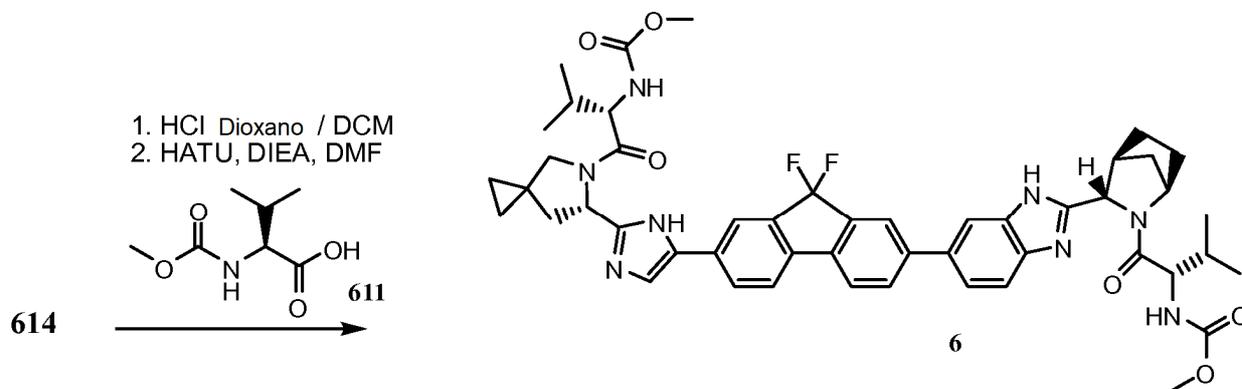


Se trató cloruro de trimetilsulfoxonio (79 mg, 0,62 mmol) en DMSO (1,5 ml) con hidruro de sodio (21 mg, dispersión en aceite al 60 %, 0,53 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarbonil]-amino]-tiofeno-2-carboxílico deseado **507** en THF (1 ml + 0,5 ml) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante 45 min. La solución de color naranja se trató con ácido cítrico al 5 % hasta pH 3 y se repartió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo. Los productos orgánicos combinados se lavaron con LiCl al 5 %, agua y salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. Después de la filtración y la concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20-75 %:hexanos) para proporcionar 0,134 g (rendimiento del 70 %) de éster metílico del ácido 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enocarbonil]-amino]-tiofeno-2-carboxílico **508** en forma de un polvo de color blanco.

Puede prepararse Compuesto 6 usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el

documento USSN 12/779.023 (US 20100310512 A1). También puede prepararse Compuesto 6 como se describe en el siguiente Ejemplo.

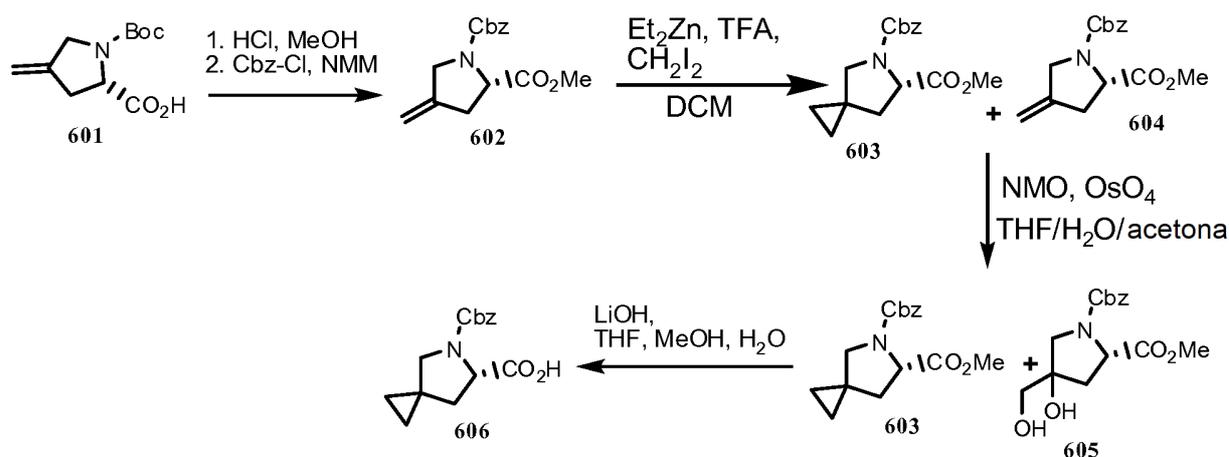
**Ejemplo 6: Preparación de éster metílico del ácido (1-{3-[6-(9,9-difluoro-7-{2-[5-(2-metoxicarbonilamino-3-metil-butiril)-5-aza-espiro[2.4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il]-9H-fluoren-2-il]-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carbonil]-2-metil-propil)-carbámico 6.**



10 Se disolvió éster terc-butílico del ácido 3-[6-(9,9-difluoro-7-{2-[5-(2-metoxicarbonilamino-3-metil-butiril)-5-aza-espiro[2.4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il]-9H-fluoren-2-il]-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **614** (115 mg, 0,138 mmol) en cloruro de metileno (2 ml) y se añadió HCl en dioxano (4 M, 2 ml) y continuó la agitación a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, todos los productos volátiles se retiraron al vacío. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. El material en bruto se disolvió en DMF (1,5 ml) y se añadió DIEA (53,4 mg, 0,414 mmol). Se añadió una solución de ácido 2-(L)metoxicarbonilamino-3-metil-butírico **611** (24,2 mg, 0,138 mmol), HATU (52,4 mg, 0,138 mmol) y DIEA (17,8 mg, 0,138 mmol) en DMF (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, la reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con solución de bicarbonato acuoso, solución acuosa de LiCl (5 %) y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y eliminación de los disolventes al vacío proporcionó el material en bruto, que se purificó mediante HPLC-FI (eluyente: agua/MeCN con TFA al 0,1 %) para proporcionar el compuesto **6** (76 mg). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>49</sub>H<sub>54</sub>F<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 888,9 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 890,0 (M+H<sup>+</sup>). RMN-<sup>1</sup>H: 300 MHz, (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8,20-7,99 (m, 8H), 7,73 (s, 2H), 7,37-7,27 (m, 2H), 5,25 (dd, J = 7,2 Hz, 1H), 4,78 (s, 1H) 4,54 (s, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,55 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 2,75 (m, 1H), 2,25 (m, 2H), 2,09-2,04 (m, 2H), 1,88-1,79 (m, 2H), 1,54 (m, 1H), 0,94-0,77 (m, 15H) 0,63 (m, 4H) ppm. RMN-<sup>19</sup>F: 282 MHz, (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: -109,1 ppm [TFA -74,8 ppm].

25

El compuesto intermedio **614** se preparó como se indica a continuación.



30 a. Preparación de compuesto éster 2-metílico del éster 1-bencílico del ácido 4-metilen-pirrolidina-1,2-dicarboxílico **602**.

35 Se disolvió éster 1-terc-butílico del ácido 4-metilen-pirrolidina-1,2-dicarboxílico **601** (10,0 g, 44 mmol) en MeOH (75 ml) a temperatura ambiente y se añadió HCl (4 M en dioxano, 75 ml). La agitación a temperatura ambiente continuó durante 4 horas. Todos los volátiles se retiraron al vacío y se obtuvo un sólido de color beige. El material en bruto se suspendió en cloruro de metileno (100 ml) y se añadió N-metil morfolina (13,3 g, 132 mmol). La mezcla se

enfrió a 0 °C y se añadió cloroformiato de bencilo (8,26 g, 48,4 mmol) mientras se agitaba. Después de 30 minutos, la reacción se calentó a temperatura ambiente y la solución se lavó con agua y HCl acuoso (1 M). La solución se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación de los disolventes proporcionó un producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto **602** (10,2 g). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: 275,3 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 276,4 (M+H<sup>+</sup>).

b. Preparación de una mezcla de los Compuestos **603** y **604**.

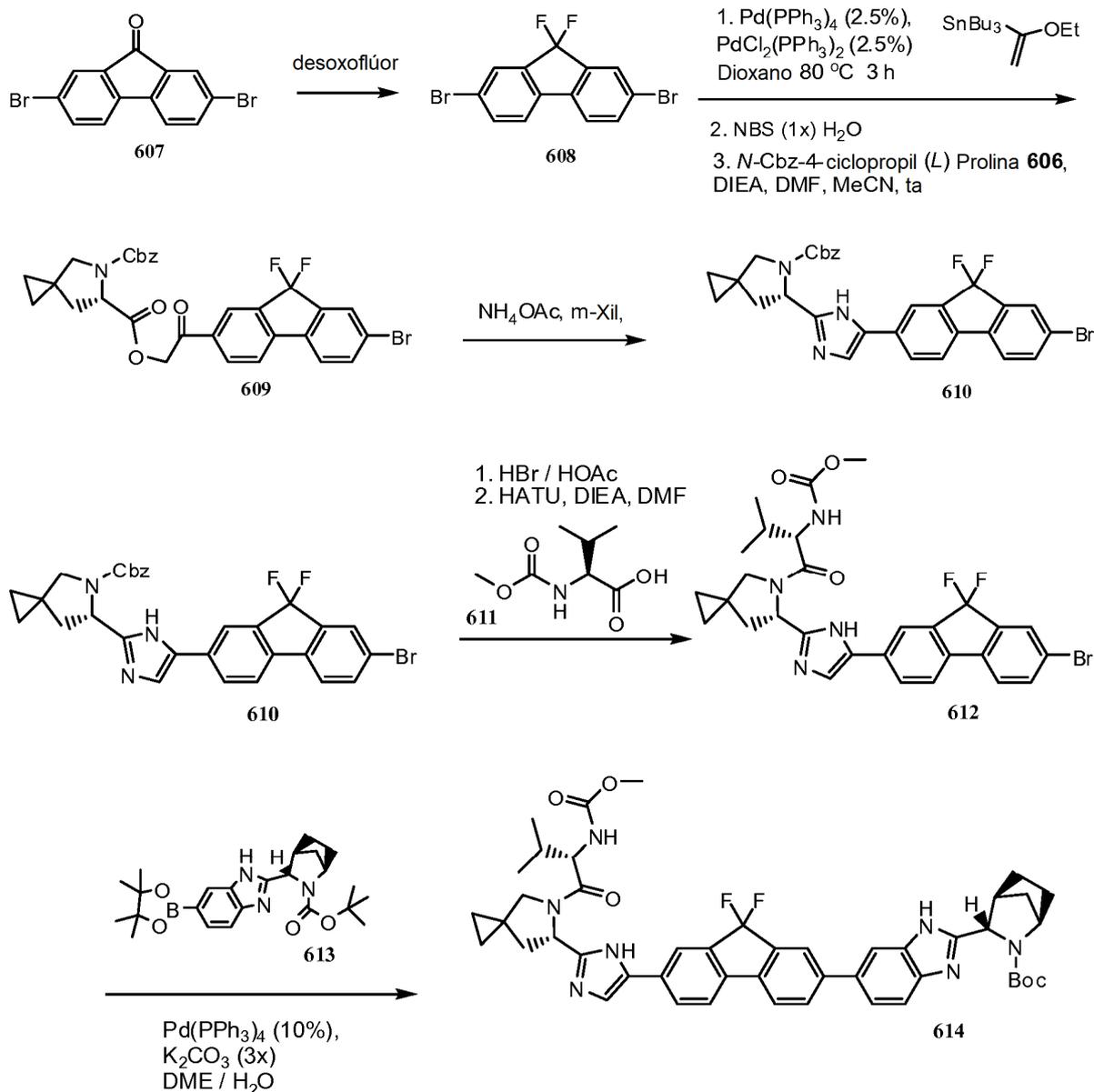
Un matraz de fondo redondo de 3 bocas secado en el horno se equipó con un adaptador de entrada de nitrógeno y un embudo de adición de 250 ml. La tercera boca se cerró herméticamente con un septo. El matraz se cargó con una barra de agitación, diclorometano (120 ml) y dietil cinc (1,0 M en hexano, 118 ml, 118 mmol) después se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. El embudo de adición se cargó con diclorometano (40 ml) y ácido trifluoroacético (9,1 ml, 118 mmol). Después de que la solución de dietil cinc se hubiera enfriado a 0 °C (aproximadamente 25 minutos), la solución de ácido trifluoroacético se añadió gota a gota durante 20 min a la mezcla de reacción agitada. Después de agitar durante otros 20 min a 0 °C, se añadió diiodometano (9,5 ml, 118 mmol) lentamente durante 4 minutos. Después de otros 20 min, se añadió éster 2-metílico del éster 1-bencílico del ácido 4-metilen-pirrolidina-1,2-dicarboxílico **602** (8,10 g, 29,4 mmol) en 30 ml de diclorometano mediante una cánula. Después, el matraz que contenía éster 2-metílico del éster 1-bencílico del ácido 4-metilen-pirrolidina-1,2-dicarboxílico se aclaró con otros 10 ml de diclorometano y esta solución también se transfirió a la mezcla de reacción mediante una cánula. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a TA y se agitó durante 110 h (aproximadamente 5 días) después de lo cual los reactivos se inactivaron con cloruro de amonio acuoso saturado (~150 ml). El contenido del matraz se decantó lentamente en un embudo de decantación de 2 l que contenía bicarbonato de sodio acuoso saturado (800 ml). La fase acuosa se extrajo tres veces con 300 ml de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron para proporcionar una mezcla de los Compuestos **603** y **604**.

c. Preparación de un Compuesto **603**.

El material en bruto a partir de la subparte b se disolvió en THF/agua/acetona (165 ml) 3:1:1 después se trató con *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (3,45 g, 29,4 mmol) y tetróxido de osmio (4 % en peso en agua, 5 ml, 0,818 mmol). Después de agitar a TA durante 7 h, los reactivos se inactivaron con tiosulfato de sodio acuoso 1 M (~100 ml). El contenido del matraz se vertió en un embudo de separación de 1 l que contenía agua (~300 ml). La fase acuosa se extrajo tres veces con 300 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (EtOAc del 5 % al 45 %/hexano) para proporcionar éster 6-metílico del éster 5-bencílico del ácido 5-aza-espiro[2.4]heptano-5,6-dicarboxílico **603** en forma de un aceite transparente (5,54 g, 19,15 mmol, 65 %) en forma de un aceite transparente. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,36-7,29 (m, 5H), 5,21-5,04 (m, 2H), 4,56-4,47 (m, 1H), 3,75 (s, 1,5H), 3,60 (m, 1,5H), 0,51-0,37 (m, 2H), 2,32-2,25 (m, 1H), 1,87-1,80 (m, 1H), 0,64-0,51 (m, 4H).

d. Preparación de éster 5-bencílico del ácido 5-aza-espiro[2.4]heptano-5,6-dicarboxílico **606**.

Se disolvió éster 6-metílico del éster 5-bencílico del ácido 5-aza-espiro[2.4]heptano-5,6-dicarboxílico **603** (244 mg, 0,840 mmol) en THF (2,0 ml)/MeOH (1,5 ml). Se añadió una solución acuosa de LiOH (35,5 mg, 0,84 mmol) y la agitación a temperatura ambiente continuó. Después de 3 horas, la reacción se neutralizó con HCl acuoso (1 M) y los disolventes orgánicos se retiraron al vacío. La mezcla en bruto se diluyó con agua y EtOAc y se recogió la capa orgánica. Todos los productos volátiles se retiraron al vacío y el ácido en bruto **606** se usó sin purificación adicional. CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: 275,3 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 276,3 (M+H<sup>+</sup>).



e. Preparación de un 2,7-dibromo-9,9-difluoro-9H-fluoreno **608**.

- 5 Se suspendió 2,7-dibromo-fluoreno-9-ona **607** (4,0 g, 11,8 mmol) en desofoflúor (12 ml) a temperatura ambiente y se añadió EtOH (4 gotas). La suspensión agitada se calentó a T = 90 °C durante 24 horas (**PRECAUCIÓN: El uso de desofoflúor a temperaturas elevadas, como se ha descrito anteriormente, se advierte ya que puede ocurrir exotermias rápidas y violentas**). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en hielo que contenía bicarbonato de sodio. Se formó un sólido y se recogió por filtración. El material en bruto se recogió en EtOAc y se lavó con HCl acuoso (1 M) y salmuera. La solución se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación de los disolventes proporcionó un producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar **608** (3,2 g). RMN <sup>19</sup>F: 282 MHz, (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: -111,6 ppm. Antes de usar el material en la siguiente etapa, se expuso en forma de una solución en EtOAc a carbón.

- 15 f. Preparación de éster 6-[2-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoreno-2-il)-2-oxo-etílico] del éster 5 bencílico del ácido 5-aza-espiro[2.4]heptano-5,6-dicarboxílico **609**.

- 20 Se disolvieron 2,7-dibromo-9,9-difluoro-9H-fluoreno **608** (372 mg, 1,04 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (30,0 mg, 0,026 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (18,2 mg, 0,026 mmol), As(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (5,0 mg) en dioxano (10 ml) en una atmósfera de argón. Se añadió etoxivinil-tributil estaño (376,4 mg, 1,04 mmol). La mezcla se calentó durante 140 minutos a 85 °C (baño de aceite). La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió *N*-bromo succinimida (177 mg, 1,0 mmol) seguida de agua (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después de lo cual la mayor parte del dioxano

se retiró al vacío. La mezcla de reacción en bruto se diluyó con EtOAc y se lavó con agua. Todos los productos volátiles se retiraron al vacío. Se añadió tolueno y todos los productos volátiles se retiraron al vacío una segunda vez. El material en bruto se disolvió en DMF/MeCN (2 ml, 1:1) a temperatura ambiente. Se añadió una solución de N-Cbz-4-ciclopropil (L) prolina **606** (0,84 mmol) y DIEA (268 mg, 2,08 mmol) en MeCN (2 ml) y continuó la agitación a temperatura ambiente. Después de 14 horas, la mayor parte del MeCN se retiró al vacío y la mezcla de reacción en bruto se diluyó con EtOAc. La mezcla se lavó con HCl acuoso (1 M), solución de LiCl acuoso (5 %) y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y la evaporación de los disolventes proporcionaron el producto de reacción en bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto **609** (176 mg). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>BrF<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>: 596,4 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 595,2/597,2 (M+H<sup>+</sup>).

g. Preparación de éster bencílico del ácido 6-[5-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-espiro[2,4]heptano-5-carboxílico **610**.

Se disolvió éster 6-[2-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-2-oxo-etílico] del éster 5-bencílico del ácido 5-aza-espiro[2,4]heptano-5,6-dicarboxílico **609** (172 mg, 0,293 mmol) en m-xilenos (6,0 ml). Se añadió acetato de amonio (226 mg, 2,93 mmol) y la reacción se agitó a 140 °C durante 60 minutos en condiciones de microondas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y todos los productos volátiles se retiraron al vacío. El material en bruto se purificó a través de cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto **610** (80,3 mg). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 576,4 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 575,2/577,2 (M+H<sup>+</sup>).

h. Preparación de éster metílico del ácido (1-{6-[5-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-espiro[2,4]heptano-5-carbonil}-2-metil-propil)-carbámico **612**.

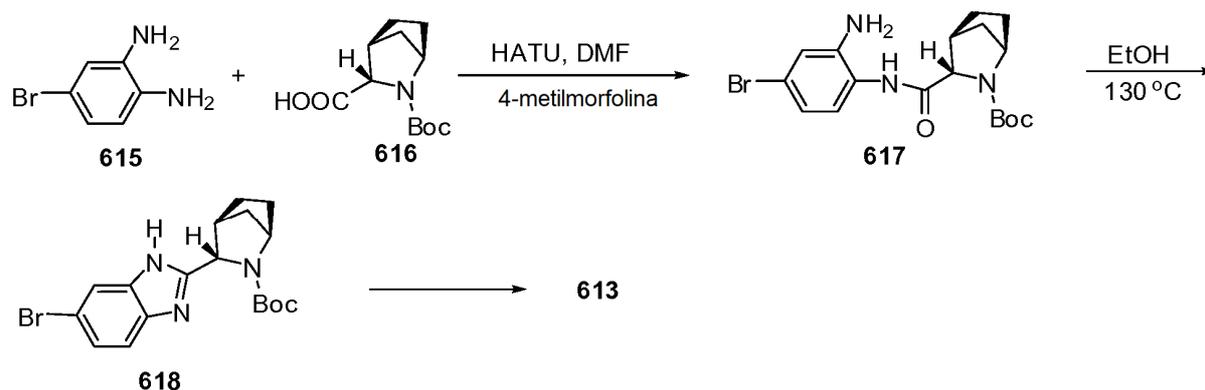
Se disolvió éster bencílico del ácido 6-[5-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-espiro[2,4]heptano-5-carboxílico **610** (800 mg, 1,38 mmol) en cloruro de metileno (15 ml) y se añadió HBr en AcOH (37 %, 2 ml) y la agitación continuó a temperatura ambiente. Después de 180 minutos, la suspensión se diluyó con hexanos y el sólido se recogió por filtración y se lavó con hexanos y se sometió al vacío. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. El material en bruto se disolvió en DMF (4,0 ml) y se añadió DIEA (356 mg, 2,76 mmol). Se añadió una solución de ácido 2-(L)-metoxycarbonil-amino-3-metil-butírico **611** (242 mg, 1,38 mmol), HATU (524 mg, 1,38 mmol) y DIEA (178 mg, 1,38 mmol) en DMF (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 50 minutos, la reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con solución de bicarbonato acuoso, solución acuosa de LiCl (5 %), salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y retirada de los disolventes al vacío proporcionó el material en bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto **612** ligeramente impuro (878 mg). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 599,5 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 598,5/600,5 (M+H<sup>+</sup>).

i. Preparación de éster terc-butílico del ácido 3-[6-(9,9-difluoro-7-{2-[5-(2-metoxycarbonil-amino-3-metil-butiril)-5-aza-espiro[2,4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il}-9H-fluoren-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo [2.2.1]heptano-2-carboxílico **614**.

Se disolvieron éster metílico del ácido (1-{6-[5-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-espiro[2,4]heptano-5-carbonil}-2-metil-propil)-carbámico **612** (840 mg, 1,4 mmol), éster terc-butílico del ácido 3-[6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **613** (615 mg, 1,4 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (161 mg, 0,14 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (579 mg, 4,2 mmol), en DME (15 ml)/agua (3 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla se calentó durante 120 minutos a 85-90 °C (baño de aceite). Después de 120 minutos se añadió éster de boronato adicional (61 mg, 0,14 mmol) y el calentamiento continuó. Después de 3 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mayor parte del DME se retiró al vacío y la mezcla de reacción en bruto se diluyó con EtOAc. La mezcla se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y la evaporación de los disolventes proporcionaron el producto de reacción en bruto, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto **614** (878 mg). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>F<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>: 831,9 (M<sup>+</sup>); Encontrado: 832,7 (M+H<sup>+</sup>).

El compuesto intermedio **613** puede prepararse como se indica a continuación

55



j. Preparación de éster *tert-butílico* del ácido 3-(2-amino-4-bromo-fenilcarbamoyl)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **617**.

5 A una solución de éster 2-*tert*-butílico del ácido 2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2,3-dicarboxílico **616** (0,327 g, 1,36 mmol, 1 eq.), 4-bromo-benceno-1,2-diamina **615** (0,507 g, 2,71 mmol, 2 eq.) y 4-metilmorfolina (0,299 ml, 2 eq.) en 10 ml de DMF se le añadió HATU (0,543 g, 1,05 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora después se concentró. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución acuosa diluida NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. La capa orgánica se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo del 20 a 80 %/hexano) para proporcionar una mezcla del regioisómero éster *tert-butílico* del ácido 3-(2-amino-4-bromo-fenilcarbamoyl)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **617**.

15 k. Preparación de éster *tert-butílico* del ácido 3-(6-bromo-1H-benzimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **618**.

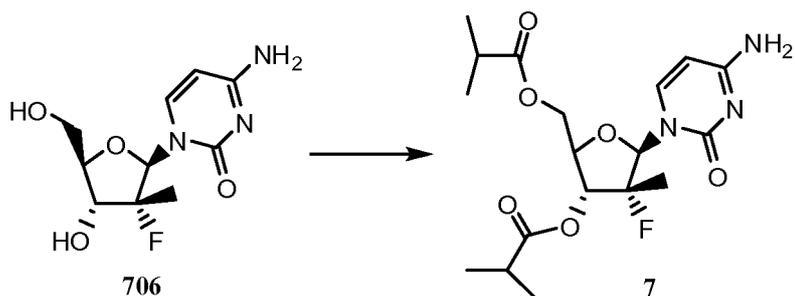
20 La mezcla anterior de regioisómero éster *tert-butílico* del ácido 3-(2-amino-4-bromo-fenilcarbamoyl)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **617** se disolvió en etanol y se calentó a 130 °C en un tubo cerrado herméticamente durante la noche y el calentamiento continuó a 170 °C durante 3 días. La CL-EM mostró el producto deseado y el producto escindido por Boc (relación de aproximadamente 1:1). La mezcla se concentró y se disolvió en HCl. Se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (0,6 eq.) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo del 20 a 80 %/hexano) para proporcionar éster *tert-butílico* del ácido 3-(6-bromo-1H-benzimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **618** (0,383 g, 72 %) en forma de una espuma de color naranja.

l. Preparación de Compuesto **613**.

30 Una mezcla de éster *tert-butílico* del ácido 3-(6-bromo-1H-benzimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **618** (264 mg, 0,673 mmol), éster dipinocálico del ácido benceno-1,4-diborónico (5 eq., 3,36 g, 6,95 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (5 %, 39 mg) y solución acuosa de carbonato de potasio 2 M (3 eq., 1,01 ml) en 5 ml de DME se calentó a 90 °C en atmósfera de Ar durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó en acetato de etilo y se lavó con solución de bicarbonato de sodio saturado. La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>), se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo del 20 al 60 %/hexano) para proporcionar éster *tert-butílico* del ácido 3-{6-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenil]-1H-benzimidazol-2-il}-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico **613** (295 mg, rendimiento del 85 %). CL-EM-IEN<sup>-</sup>: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>BN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 515,45; Encontrado: 516,1 (M+H<sup>+</sup>).

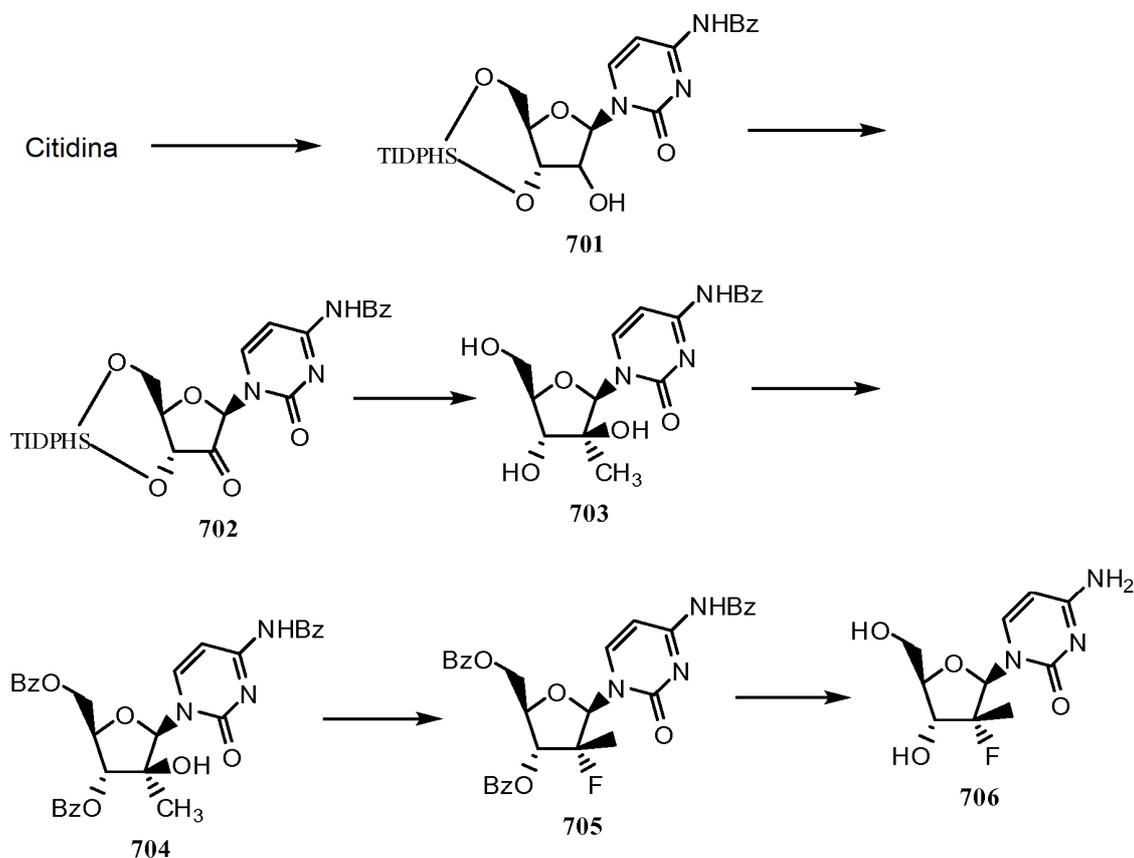
40 Puede prepararse Compuesto **7** usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el documento US 7.429.572. También puede prepararse Compuesto **7** como se describe en el siguiente Ejemplo.

**Ejemplo 7: Preparación de Compuesto 7.**



A una suspensión enfriada en hielo de compuesto **701** (970 g, 3,74 mol) y DMAP (50 g, 0,412 mol) en THF (10 l) se le añadió TEA (2,3 kg, 16,5 mol) y agua (7 l), que produce una solución transparente. Se añadió cloruro de isobutirilo (3 equivalentes) lentamente a la mezcla agitada mientras se mantenía la temperatura a aproximadamente 0 °C. Después se añadieron 1,2 equivalentes adicionales, después, 0,7 equivalentes de cloruro de isobutirilo hasta que la HPLC indicó que la reacción había procedido esencialmente a la finalización (un total de aproximadamente 1,95 kg). La mezcla de reacción se acidificó con HCl concentrado a un pH de aproximadamente 6,4 y la fase orgánica se lavó con EtOAc (10 l, 2 veces). Los extractos combinados se lavaron con agua (15 l, 1 vez). La fase orgánica se filtró y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en IPA (aproximadamente 20 kg) y se añadió heptano (14,2 kg). La solución se calentó a aproximadamente 74-75 °C para producir una solución transparente, después, se retiraron aproximadamente 5 l por destilación. La solución resultante se enfrió lentamente a TA. Se formó un precipitado a aproximadamente 42-43 °C. El enfriamiento continuó lentamente a 5 °C y después se agitó durante la noche. El sólido resultante se filtró y el filtrado se lavó con mezcla (1:8) de IPA/heptano (13,4 kg) y se secó al vacío a aproximadamente 60-70 °C para proporcionar 1,295 kg (86,65 %) de compuesto **7**, que era puro al 99,45 % mediante HPLC.

El compuesto intermedio **706** puede prepararse como se indica a continuación.



20

#### a. Preparación de Compuesto **701**.

A una suspensión de citidina (100 g, 0,411 mol) en DMF (2,06 l) se le añadió anhídrido benzoico (102,4 g, 0,452 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La DMF se retiró al vacío y el residuo se

25

trituro con éter dietílico. El sólido resultante se recogió mediante filtración por succión y se lavó con éter dietílico (200 ml, 2 veces). El secado adicional al vacío a temperatura ambiente proporcionó la *N*<sup>4</sup>benzamida (140,6 g, 98,3 %). Una porción de este material (139,3 g, 0,401 mol) se disolvió en piridina anhidra (1,2 l) y se trató con 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (141,4 ml, 0,441 mol) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró casi a sequedad al vacío y se coevaporó con tolueno (200 ml, 3 veces). El residuo se trató con EtOAc (1,8 l) y se lavó con HCl (200 ml, 2 veces, 0,05 N), NaHCO<sub>3</sub> (5 %, 400 ml, 2 veces). La capa orgánica se lavó se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó a sequedad. Se aisló Compuesto **701** (256,5 g, >100 %) en forma de una espuma de color blanco y se usó sin purificación adicional.

#### 10 b. Preparación de Compuesto **702**.

Se disolvió Compuesto **701** (236,5 g, 0,40 mol) en THF seco (1,22 l). Se añadió DMSO anhidro (180,8 ml, 2,1 mol) y la solución resultante se enfrió a entre -20 °C y -15 °C. Se añadió anhídrido trifluoroacético (90,6 ml, 0,64 mol) gota a gota durante 45 minutos y la solución se agitó entre -20 °C y -15 °C durante 2 horas después de lo cual se añadió trietilamina anhidra (223,5 ml, 1,6 mol) durante 20 minutos. La reacción en bruto que contenía la cetona **702** se disolvió en EtOAc (500 ml) y la solución resultante se lavó con H<sub>2</sub>O (400 ml, 3 veces), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y los disolventes se retiraron al vacío para proporcionar un sólido de color amarillo que se purificó en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente por etapas de Et<sub>2</sub>O (0-60 %) en hexanos, seguido de un gradiente en etapas de EtOAc (50-100 %) en hexanos. La cetona en bruto obtenida de este modo (~192 g) se cristalizó en éter de petróleo para proporcionar la cetona **702** (138,91 g, 57,5 % a partir de citidina) en forma de un sólido de color blanco y 22 g de material de partida sin reaccionar, **701**, en forma de un sólido de color amarillo.

#### 20 c. Preparación de Compuesto **703**.

Se disolvió Compuesto **702** (48,57 g, 8,26 mmol) en tolueno anhidro (~400 ml) y el disolvente se retiró al vacío con exclusión de humedad. Después, el residuo se secó adicionalmente al vacío (bomba de aceite) durante otras 2 horas. Con exclusión de humedad estricta, la espuma residual se disolvió en éter dietílico anhidro (1,03 l) en argón. La solución resultante se enfrió a -78 °C en atmósfera de argón y se añadió MeLi (1,6 M, 258,0 ml, 0,413 mol) gota a gota mediante embudo de adición. Después de la adición fuera completa, la mezcla se agitó durante 2 horas a -78 °C. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso 1 M (500 ml) lentamente. Después de calentar a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con H<sub>2</sub>O (500 ml, 2 veces), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y después se concentró a sequedad para proporcionar una espuma de color marrón (~60 g, >100 %).

La reacción se realizó dos veces más utilizando 37,62 g y 56,4 g de compuesto **702**. Los productos en bruto combinados (128,0 g, 0,212 mol) se disolvieron en THF (1,28 l) y se trataron con HOAc concentrado (23 ml, 0,402 mol). A la solución se le añadió TBAF (384,0 ml, 1 M en THF). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0,75 horas y la mezcla se trató con gel de sílice (750 g) y se concentró a sequedad. El polvo se colocó en una columna de gel de sílice rellena en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La elución con EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:7 proporcionó un sólido ceroso oscuro que se preadsorbió sobre gel de sílice (300 g) y se cromatografió como antes. Se aisló Compuesto **703** (46,4 g, 53,0 % a partir de **702**) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH 2'), 5,52 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz), 7,50 (Ψt, 2H, *J* = 7,7 Hz), 7,62 (Ψ, 1H, *J* = 7,3 Hz), 8,00 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz), 8,14 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> • 0,5 H<sub>2</sub>O: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Encontrado: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

#### 45 d. Preparación de Compuesto **704**.

Se disolvió Compuesto **703** (46,0 g, 0,13 mol) en piridina anhidra y se concentró a sequedad al vacío. El jarabe resultante se disolvió en piridina anhidra en atmósfera de argón y se enfrió a 0 °C con agitación. La solución de color marrón se trató con cloruro de benzoilo (30 ml, 0,250 mol) gota a gota durante 10 minutos. El baño de hielo se retiró y la agitación continuó durante 1,5 horas, con lo que el análisis por CCF no mostró nada de material de partida restante. La mezcla se inactivó mediante la adición de agua (5 ml) y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (500 ml, 1 vez) y H<sub>2</sub>O (500 ml, 1 vez). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se filtró, se concentró a sequedad y se cromatografió en gel de sílice eluyendo con un gradiente por etapas de EtOAc-hexanos (25-60 %) para proporcionar el compuesto **704** en forma de una espuma de color amarillo (48,5 g, 67 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1'), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, *J* = 7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz). Análisis calculado para C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub>: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38. Encontrado: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

#### 60 e. Preparación de Compuesto **705**.

Se disolvió Compuesto **704** (7,50 g, 0,013 mol) en tolueno anhidro (150 ml) en atmósfera de argón y se enfrió a -20 °C. Se añadió DAST (2,5 ml, 18,9 mmol) lentamente y el baño de enfriamiento se retiró después de que la adición fuera completa. Se continuó agitando durante 1 hora y la mezcla se vertió en solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) y se lavó hasta que cesó el desprendimiento de gas. La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se concentró y se purificó

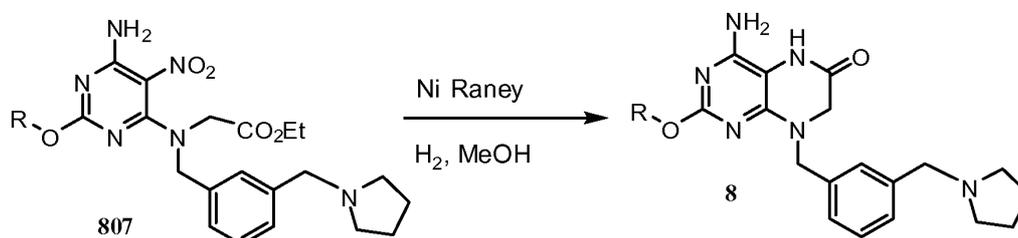
mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc-hexanos 1:1. El rendimiento fue de 1,22 g (16,3 %) de **705** en forma de un sólido de color blanco. pf 241 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexanos); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,49 (d, 3H, J = 22,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,64 (dd, 1H, J = 3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, J = 2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, J = 8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, J = 18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (sa, 1H, NH). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,3 (m). Análisis calculado para C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>•0,7 H<sub>2</sub>O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Encontrado: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

#### f. Preparación de Compuesto **706**.

- 10 Se suspendió Compuesto **705** (6,30 g, 0,011 mol) en amoníaco metanólico (aproximadamente 7 N, 150 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retiró al vacío, se coevaporó con metanol (20 ml, 1 vez) y se preadsorbió en gel de sílice. El polvo de color blanco se colocó en una columna de gel de sílice (rellena de CHCl<sub>3</sub>) y la columna se eluyó con EtOH al 9 % en CHCl<sub>3</sub>, después, EtOH al 17 % y por último EtOH al 25 % en CHCl<sub>3</sub>. La concentración de las fracciones que contenían el producto, la filtración a través de un disco de 0,4 mm y la liofilización a partir de agua proporcionó el Compuesto **706**, 2,18 g (76 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,17 (d, 3H, J = 22,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,63 (dd, 1H, J = 2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (s ap, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, J = 7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, J = 18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7,42 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7,90 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H-6). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,60 (m). Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>•1,4 H<sub>2</sub>O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Encontrado: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. El Compuesto **706** (0,10 g, 0,386 mmol) se convirtió en la sal de clorhidrato resolviendo en agua (2 ml) y ajustando el pH a aproximadamente 3,0 con HCl 1 M. El agua se retiró al vacío y el residuo se cristalizó en EtOH acuoso para proporcionar el Compuesto **706** en forma de la sal de clorhidrato (71,0 mg). pf 243 °C (dec); RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,29 (d, 3H, J = 22,6 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,65 (dd, 1H, J = 2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, J = 17,3 Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,69 (m). Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>•HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Encontrado: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

Puede prepararse Compuesto **8** usando métodos de síntesis e intermedios como los que se describen en el documento USSN 12/632.194. También puede prepararse Compuesto **8** como se describe en el siguiente Ejemplo.

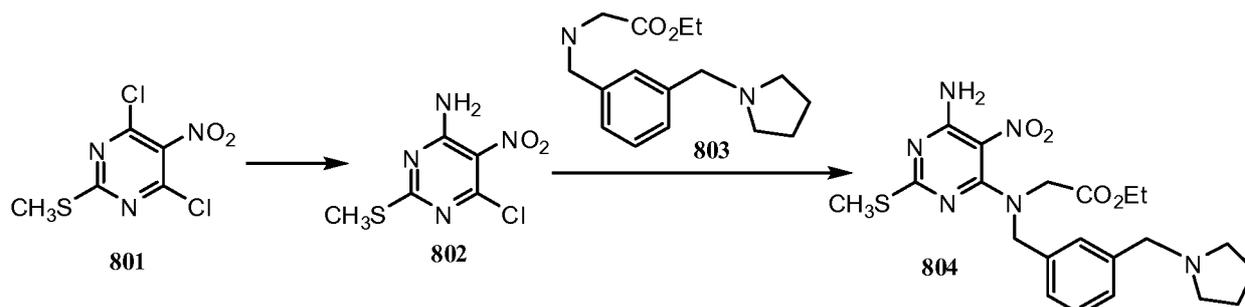
- 30 **Ejemplo 8: Preparación de 4-amino-2-n-butoxi-8-[3'-(pirrolidin-1"-ilmetil)-bencil]-5,6,7,8-tetrahidropteridin-6-ona **8**. (R = n-butilo)**



- 35 A una solución del nitro compuesto **807** (730 mg, 1,5 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió níquel Raney (-200 µl, suspensión en H<sub>2</sub>O). El recipiente de reacción se lavó abundantemente con H<sub>2</sub> y después se agitó en una atmósfera H<sub>2</sub> de durante 1,5 horas. La mezcla se filtró a través de celite con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH (1:1). El filtrado se concentró al vacío y se dejó en un liofilizador durante la noche. La base libre del compuesto **8** se obtuvo en forma de un sólido de color blanco para obtener la sal de HCl de **8**, a una muestra de filtrado anterior se le añadió HCl 1,0 M a pH = 1-2 y se liofilizó. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 7,65 (s, 1H), 7,50 (m, 3H), 4,96 (s, 2H), 4,44 (t, J = 7 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,48 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,02-2,17 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,94 (t, J = 7 Hz, 3H) - [sal de HCl]. CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 411,5 (M+H<sup>+</sup>); descubierto: 411,3 (M+H<sup>+</sup>).

El compuesto intermedio **807** se preparó como se indica a continuación.

45

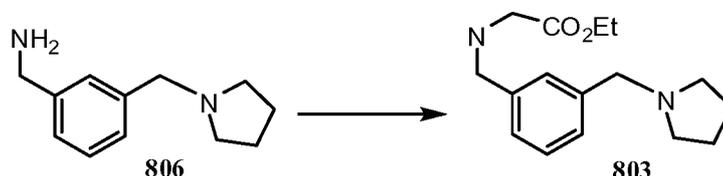


#### a. Preparación de Compuesto **802**.

A una solución de compuesto **801** (2,46 g, 10,2 mmol) en THF (34 ml) a -20 °C se le añadió Et<sub>3</sub>N (3,14 ml, 22,5 mmol) seguido de una solución de NH<sub>3</sub> (2,0 M en MeOH, 5,4 ml, 11 mmol). La mezcla se agitó mientras se calentaba a 0 °C durante 1,5 h (el análisis por CL/EM indicó el consumo de materiales de partida). La mezcla de reacción que contenía el compuesto **802** se llevó a la siguiente etapa sin tratamiento.

5

b. Preparación de Compuesto **803**.



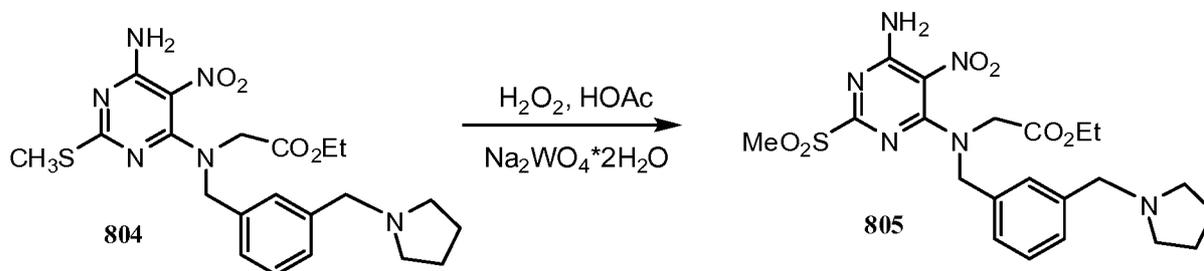
10 A una solución de 3-((1-pirrolidinilmetil)fenil)metanamina **806** (1,95 g, 10,2 mmol) en THF (34 ml) a 0 °C se le añadió Et<sub>3</sub>N (3,14 mmol, 22,5 mmol) seguida de bromoacetato de metilo (1,04 ml, 22,3 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó hasta que el análisis por CL/EM indicó el consumo de materiales de partida, aproximadamente 2 horas. La mezcla que contenía el compuesto **803** se llevó a la siguiente etapa sin tratamiento.

15 c. Preparación de Compuesto **804**.

La mezcla de reacción que contiene el compuesto **803** se añadió a la mezcla de reacción que contenía el compuesto **802** a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó hasta que el análisis por CL/EM indicó el consumo del compuesto **802**, aproximadamente 45 minutos. Se añadió una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (50 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (30 ml, 2 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice proporcionó 2,11 g del compuesto **804**. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ (ppm) 7,32-7,16 (m, 4H), 4,69 (s, 2H), 4,19 (c, J = 7 Hz, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,60 (s, 2H), 2,49 (m, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,78 (m, 4H), 1,23 (t, 3 H, J = 7 Hz). CLEM-IEN<sup>+</sup>: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S: 461,2 (M+H<sup>+</sup>); Encontrado: 461,0 (M+H<sup>+</sup>).

25

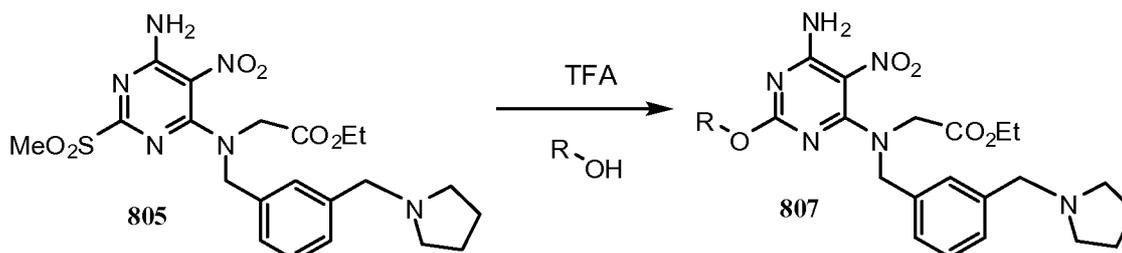
d. Preparación de etil-N<sub>α</sub>-[4-amino-2-metanosulfonil-5-nitropirimidin-6-il],N<sub>α</sub>-[3'-(pirrolidin-1"-ilmetil)-bencil]-glicinato **805**.



30

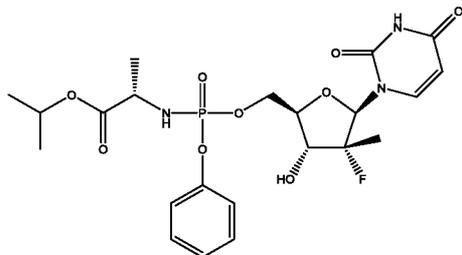
A una solución una suspensión del sulfuro **804** (3,68 g, 8,00 mmol) en EtOH (40 ml) a 0 °C se le añadieron dihidrato de tungstato de sodio (792 mg, 2,40 mmol), ácido acético (4,6 ml, 80 mmol) y peróxido de hidrógeno (3,4 ml, -40 mmol, 35 % p/p en H<sub>2</sub>O) secuencialmente. Después de 3 horas, se añadieron ácido acético (4,6 ml) y peróxido de hidrógeno (3,4 ml) adicionales. La reacción se mantuvo a 0 °C durante 16 horas. Se añadió una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (50 ml) cuidadosamente mientras que estaba a 0 °C seguida de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml, 4 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar un material compuesto que contenía **805** que se usó sin purificación adicional.

40 e. Preparación de Compuesto **807**. (R = n butil)



A una solución de la sulfona **805** (1,0 g, 2,0 mmol) en n-butanol (10 ml) se le añadió TFA (470 µl, 6,1 mmol). La reacción se agitó a 100 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se vertió sobre una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía en gel de sílice (1 g de sustrato/10 g de SiO<sub>2</sub> (MeOH al 2-15 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar el compuesto **807**.

#### Ejemplo 9: Preparación de Compuesto 9 (del documento US2010/0298257)



10

9

Preparación de éster isopropílico del ácido (S)-2-(((1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-il-metoxi]-fenoxifosforilamino)-propiónico (del Ejemplo 2 del documento US2010/0298257)

15

Sinónimo: mezcla diastereomérica de 5'-O-(L-alanato de isopropilo, fenil fosforamidilo)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina.

20

Un matraz de 3 bocas de 5 l se equipó con un agitador mecánico, baño de hielo y salmuera, termómetro interno y una atmósfera de nitrógeno. El matraz se cargó con clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (82,0 g, 0,490 moles) y diclorometano anhidro (0,80 l). Mientras que esto se agitaba, se añadió diclorofosfato de fenilo (85,0 g, 0,40 moles) en una porción y se agitó. Mientras se mantenía la temperatura interna entre -5 a 5 °C, se añadió una solución de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 moles) en diclorometano (250 ml) durante un periodo de una media hora. La solución se dejó en agitación durante 1 h en este intervalo de temperatura. Se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3,80 g, 0,307 moles) a 0 °C en una porción y después el matraz de reacción se dejó calentar lentamente en el baño de salmuera. En 1 h, la temperatura interna era de hasta -2 °C. El análisis por CCF (metanol al 5 % en HCL) mostró en 1 h que más del 50 % de nucleósido se había consumido. El baño se retiró y el matraz de reacción alcanzó la temperatura ambiente durante 1 h más. El análisis por CCF después de 3 h y 5 h totales mostró que el 95 % del nucleósido de partida se había consumido. La mezcla de reacción se inactivó añadiendo metanol (100 ml) y agitando la reacción durante 5 minutos.

30

La mezcla de reacción se lavó con HCl 1 N (500 ml, 2 veces) seguido de una solución de bicarbonato de sodio saturado (500 ml, 2 veces). La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g) y se filtró. La solución se evaporó a presión reducida y después a alto vacío a sequedad para proporcionar el producto bruto en forma de un aceite viscoso (170 g). Se tomaron RMN del producto en bruto (<sup>31</sup>P y <sup>1</sup>H). La RMN <sup>31</sup>P indicó que aproximadamente el 1 % de la integración total de fósforo era debido a la presencia del isómero 3' 5'.

35

Al producto en bruto se le añadió piridina anhidra (1700 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida y después a alto vacío con el fin de reducir el contenido de agua de la mezcla en bruto a través de coevaporación. El aceite resultante se volvió a disolver en piridina anhidra (500 ml) y después se añadió cloruro de t-butildimetilsililo en exceso (9,0 g, 60 mm). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló por UPCL/EM. Después de 3 horas, la impureza 3' 5' ya no se pudo detectar y la reacción se interrumpió mediante la adición de metanol (50 ml).

40

La reacción se evaporó a presión reducida a un aceite. El residuo se disolvió en acetato de etilo (1,5 l) y se lavó con HCl 1 N (500 ml, 2 veces), seguido de solución de bicarbonato sódico saturado (500 ml, 2 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g), se filtró y se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto bruto en forma de un aceite de color amarillo pálido.

45

El aceite en bruto se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y se cargó en un cartucho de gel de sílice de 2,5 kg en un módulo de compresión radial a 100 psi (6,89 kPa) de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 60 psi (413,68 kPa) y un causal de 400 ml/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4 l), seguido de un gradiente de metanol al 1-4 % en cloruro de metileno (48 l). La mayor parte de las impurezas principales de fenil fosfato de (di-(isopropilalano), 3',5'-bis fosforamidato, aducto de 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (7)) se eluyó con un gradiente del ~3 %. El producto deseado se eluyó en metanol entre el 3 y el 4 %. El producto que contenía las fracciones se clasificó en dos lotes. El primero contenía pequeñas cantidades de impurezas superiores y el último era producto puro. El primer conjunto de fracciones contenía pequeñas cantidades de impurezas menos polares

55

(impurezas superiores), tales como el 3',5'-bis fosforamidato y el fosfato de di-alanilfenilo y en su mayoría el diastereoisómero Rp y requirió una segunda purificación en columna. (La terminología relativa, superior frente a inferior se refiere a la elución en la cromatografía en gel de sílice de fase normal, donde el "isómero superior" significa el primer isómero en eluir). El segundo conjunto de fracciones no tenía una cantidad significativa de impurezas, solo el Rp restante y en su mayoría los diastereoisómeros Sp. Más tarde se recombinó con las fracciones de columnas dos veces. El disolvente se evaporó a presión reducida y la espuma de color blanco resultante se secó adicionalmente (0,20 mmHg (2,66 kPa)) durante 1 h para proporcionar 42 g del lote impuro (4:1 isómero superior frente a inferior basado en RMN <sup>31</sup>P) y 38 g del lote puro (1:3 isómero superior frente a inferior). El lote impuro se volvió a pasar por la columna de una manera similar para proporcionar 3,8 g del isómero superior puro en un 97 % (fracción apartada) y 36 g de producto puro en una relación 4:1. Los dos lotes principales se disolvieron en HCl, se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg (0,266 kPa), 24 h) para obtener 74 g (45,7 %) de producto puro (Compuesto 9) con una relación diastereomérica de 48:51, en forma de una espuma de color blanco, pf 75-85 °C.

Con el fin de producir un sólido amorfo de la mezcla diastereomérica, se agitaron 74 g de la espuma blanca con t-butil metil éter (750 ml) dando como resultado una solución parcial y un residuo sólido gomoso. Mientras se agitaba, se añadieron heptanos (750 ml) lentamente y la suspensión se agitó mecánicamente durante 1 hora hasta que la mayor parte de la goma se convirtió en un sólido de color blanco. El sólido se separó por rascado con una espátula y la suspensión resultante se filtró. El sólido se lavó con heptanos (50 ml, 4 veces) y se secó al vacío (50 °C, 0,2 mmHg (0,266 kPa), 24 h) para proporcionar un polvo de color blanco, amorfo (64 g) con un amplio intervalo de fusión de aproximadamente 70-80 °C. RMN <sup>1</sup>H y <sup>31</sup>P se ajustaron a la estructura y la HPLC mostró una pureza del 99,8 % con una proporción diastereomérica de 46:54 (también confirmada por RMN <sup>31</sup>P).

Método alternativo para hacer una mezcla sólida de Compuesto 9. Después de la cromatografía, el residuo se coevaporó con diclorometano dos veces (5 ml/g) y se secó durante 24 horas a 35-40 °C a 35-45 mTorr (4,66-5,99 Pa). El residuo de espuma se tamizó a través un tamiz de 250 micrómetros y se secó adicionalmente en las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó por debajo de 400 ppm, medido por CG de cámara de aire. El polvo de color blanquecino a blanco amorfo fino resultante tiene un intervalo de temperaturas de transición vítrea de 53,7 a 63,5 °C.

Caracterización del compuesto 9 (mezcla de isómeros):

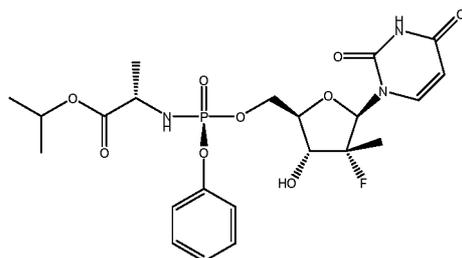
RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 010,05 (sa, 1H, NH, Sp), 10,00 (sa, 1H, NH, Rp), 7,49 (d, 1H, C6-H, Sp), 7,36 (m, 5H, C6-H, Rp, aromático), 7,23-7,14 (m, 6H, Rp/Sp, aromático), 6,18 (d a, 2H, Cl'-H, Rp/Sp), 5,63 (d, 1H, C5-H, Sp), 5,58 (d, 1H, C5-H, Rp), 5,01 (m, 2H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Rp/Sp), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H<sub>2</sub>, Ala-NH, C3'-OH, Rp/Sp), 4,12 (m, 2H, ala-CHCH<sub>3</sub>, Rp/Sp), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, Rp/Sp), 1,391.22 (m, 12H, todos CH<sub>3</sub>, Rp/Sp).

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) 03,60 (Rp), 3,20 Sp con respecto a trifenilfosfato en -17,80 ppm. EN-EM M+1 530,2. Análisis elemental: % Calculado (incluyendo agua al 0,29 % según se encuentra por análisis de Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90; F, 3,58; P, 5,84. % Encontrado: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Preparación de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (del Ejemplo 1 del documento US2010/0298257)

En un matraz de 10 l, se añadió 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2' fluoro-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina (500 g, 0,874 mol) y ácido acético acuoso al 70 % (7,5 l). La solución se calentó a reflujo (110 °C) durante 20 h. El análisis por CCF indicó una reacción completa (RfO.6 en metanol al 5 % en diclorometano (HCL)). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 l). Después de agitar durante 2 h, el precipitado resultante se recogió por filtración y el sólido se aclaró con agua (5 l) y se secó en la atmósfera a temperatura ambiente durante 12 h para proporcionar 360 g (88 %). Esta dibenzoiluridina intermedia se usó directamente en la siguiente etapa añadiéndola toda a amoníaco metanólico recién preparado (5,4 l, aproximadamente el 25 %) a 0 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y después se dejó calentar a 15 °C durante 24 h. El análisis por CCF indicó una reacción completa (Rf 0,4 en metanol al 10 % en HCl). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto en bruto (216 g). El producto en bruto se agitó con acetato de etilo (325 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió por filtración y se lavó con acetato de etilo (216 ml). El sólido se secó al vacío a temperatura ambiente durante 4 h para proporcionar 160 g (78 %) del producto deseado en una pureza por HPLC del 98,7 %. RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) 011,44 (s a, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C5'-Ha, C-3'H. C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH<sub>3</sub>). EN-EM M-I 259.

**Ejemplo 10: Preparación de Compuesto 10 (del documento US2010/0298257)**



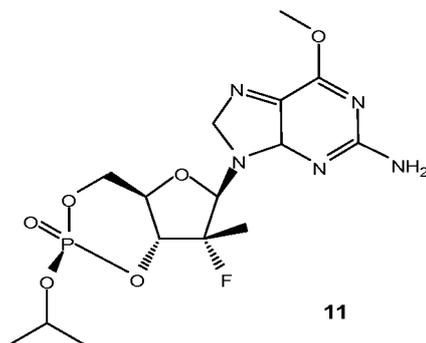
10

Precipitación directa del Compuesto 10 (del documento US2010/0298257; Ejemplo 4): A una solución agitada de clorhidrato del éster isopropílico de L-alanina (10,5 g, 61,5 mmol, secado azeotrópicamente, dos veces, con 50 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (100 ml) se le añadió fenildiclorofosfato (7,5 ml, 50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10 °C y después se añadió una solución de N-metilimidazol (30,5 ml, 384,3 mmol) en 30 ml de diclorometano durante un periodo de 30 min. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -15 °C durante 1 h. Se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina a la mezcla anterior (10 g, 38,4 mmol) (véase el Ejemplo 1 del documento US2010/0298257) en una porción y la mezcla se agitó por debajo de -10 °C durante 3 h y después se dejó calentar lentamente a 20 °C. (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15 h) y después se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (200 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (100 ml), HCl 1 N (75 ml, 3 veces), solución acuosa al 2 % de NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El residuo se secó a alto vacío durante 2 h para proporcionar una espuma de color blanco (22 g).

La espuma anterior se disolvió en 33 ml de HCl y después se añadieron 65 ml de éter isopropílico para proporcionar una solución saturada. La solución se filtró a través de un pequeño lecho de Celite y el filtrado se agitó con semillas del Compuesto 10 durante 72 h a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C - nótese que el enfriamiento de la suspensión a 0 °C. condujo a aceitar el producto en bruto). El sólido de color blanco se filtró, se lavó con éter isopropílico (20 ml) y se secó para proporcionar 4,58 g (mezcla ~85:15 del Compuesto 10: isómero R en P, respectivamente, como se determina por RMN <sup>31</sup>P) de un polvo de color blanco. El sólido anterior se suspendió en 23 ml de HCl y después se sometió a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con 4,5 ml de HCl frío y se secó a alto vacío a 45 °C para proporcionar el Compuesto 10 puro, pf 93,9 a 104,7 °C. Pureza por HPLC del 99,74 % (3,11 g, 15,2 % a partir del nucleósido uridina).

**Compuesto 10:** RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,63 (sa, <sup>1</sup>H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, O-aromático), 7,26-7,18 (m, 3H, m, p-aromático), 6,18 (d a, 1H, Cl'-H), 5,70 (d, 1H, C5'-H), 5,02 (sept, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,53 (m, 2H, C-5'-H<sub>2</sub>), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH<sub>3</sub>), 3,77 (s a, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, CH C2'-<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, CH Ala-<sub>3</sub>) 1,24 (d, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### Ejemplo 11: Preparación de Compuesto 11 (del documento US 2010/0081628)



11

Síntesis de 6-etoxi-9-((4aR,6R,7R,7aR)-7-fluoro-2-isopropoxi-7-metil-2-oxo-tetrahidro-2,5-furo[3,2-d][1,3,2]dioxafosfinin-6-il)-9H-purin-2-il-amina (Compuesto 11) (Compuesto 19, documento US 2010/0081628)

Se disolvió (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-etoxi-purin-9-il)-4-fluoro-2-hidroxi-4-metil-tetrahidrofurano-3-ol (150 mg, 0,46 mmol) en piridina anhidra (2 ml) a 0 °C. Se añadió una solución de 1H-tetrazol 0,45 M en acetonitrilo (2,55 ml) seguida de bis (N,N-diisopropilamino)isopropilfosforamida (0,16 ml, 0,55 mmol, 1,2 eq). La mezcla se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente durante 3 h. El análisis por CCF indicó una reacción completa. La reacción se interrumpió tras la adición de agua (0,1 ml). La solución de reacción se concentró a presión reducida y después el residuo se trituró con acetato de etilo (5 ml). El precipitado de color blanco resultante se retiró por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida.

El residuo fosfito cíclico intermedio resultante se disolvió en acetonitrilo (2 ml) y después se trató con hidroperóxido de t-butilo (al 70 % en agua, 0,19 ml) durante 5 h a temperatura ambiente. El análisis por CCF indicó una reacción completa. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (Analogix usando un gradiente de IPA del 0 al 5 % en HCL). Los dos diastereómeros (compuesto 11 e isómero R en P) eran separables. Las fracciones que contenían cada diastereómero se combinaron por separado y se concentraron a presión reducida a sólidos de color blanco para proporcionar 20 mg de cada diastereómero (rendimiento combinado del 20 %).

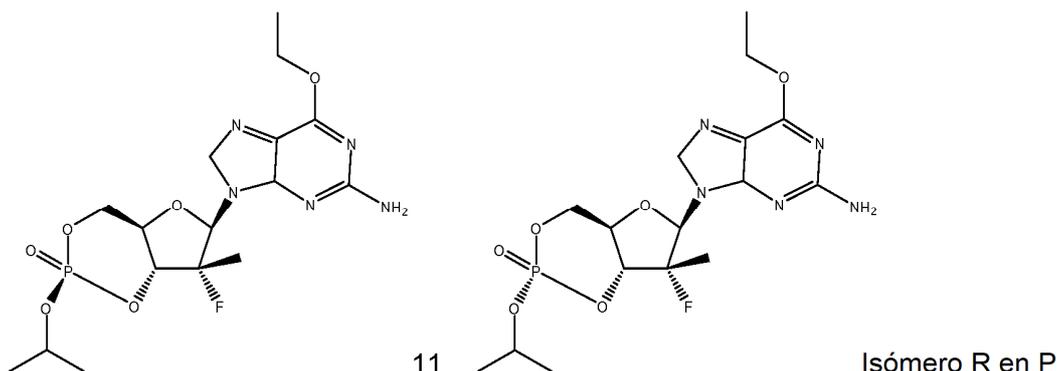
#### Compuesto 11

RMN-<sup>31</sup>P (162 MHz, DMSO):  $\delta$  -6,49;  
 RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8,17 (s, 1H), 6,47 (sa, 2H), 6,27 (d, J = 21,2 Hz, 1H), 4,73-4,62 (m, 4H), 4,45 (c, J = 7,0 Hz, 2H), 4,27-4,21 (m, 1H), 1,39-1,34 (m, 9H), 1,20 (d, J = 22,8 Hz, 3H).  
 EM (IEN): m/z 432,4 [M+H]<sup>+</sup>

#### R-isómero en P

RMN-<sup>31</sup>P (162 MHz, DMSO):  $\delta$  = -4,68;  
 RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8,15 (s, 1H), 6,63 (s, 2H), 6,27 (d, J = 21,2 Hz, 1H), 4,74-4,58 (m, 4H), 4,45 (c, J = 6,4 Hz, 2H), 4,42-4,37 (m, 1H), 1,36 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,32 (d, J = 3,6 Hz, 3H), 1,30 (d, J = 3,6 Hz, 3H), 1,22 (d, J = 22,8 Hz, 3H).  
 EM (IEN): m/z 432,4 [M+H]<sup>+</sup>

Las estructuras para el Compuesto 11 y el isómero R en P se representan a continuación.



Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-etoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahydro-furan-3-ol (Compuesto 16, documento US 2010/0081628)

A un matraz de fondo redondo seco de 500 ml se le cargó benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahydrofuran-3-ilo (11 g, 20,92 mmol). Se añadió etanol absoluto anhidro (210 ml) y seguido de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (28,91 g, 209,2 mmol). La suspensión se agitó y se calentó a 75 °C en nitrógeno durante 5,5 h. Todo el material de partida se consumió en ese momento según ensayo por CCF. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido se separó por filtración. El filtrado se neutralizó por adición de ácido acético glacial (2,52 g) a pH ~7 y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol y se mezcló con gel de sílice (15 g). La mezcla seca del producto en bruto y gel de sílice se transfirió a un cartucho vacío y se separó a través de cromatografía en columna (Analogix 220 g, gradiente de MeOH del 0 a 15 % en DCM) para proporcionar el producto (MeOH al 5 % en DCM) en forma de un sólido de espuma de color blanco (3,73 g, 54,5 %). Un segundo sólido de color blanco se aisló de la columna (MeOH al 10 % en DCM, 1,44 g) y es una mezcla de dos dímeros de nucleósido. Un tercer sólido de color blanco más polar, se recogió de la columna (MeOH al 15 % en DCM, 0,47 g) y es una mezcla de trímeros de nucleósido. Pureza del producto por HPLC del 99,94 %.

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,16 (s, 1H, 8-H), 6,55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,04 (d, 1H, C1'-H), 5,66 (d, 1H, 3'-OH), 5,24 (m, 1H, 5'-OH), 4,44 (c, 2H, 6-OCH<sub>2</sub>), 4,23-4,08 (m, 1H, C3'-H), 3,91-3,82 (m, 2H, C4'-H y C5'-H<sub>a</sub>), 3,71-3,66 (m, 1H, C5'-H<sub>b</sub>), 1,36 (t, 3H, CH<sub>3</sub> de etilo), 1,06 (d, 3H, C2'-CH<sub>3</sub>).

Síntesis de benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahydro-furan-3-ilo (Compuesto 12, documento US 2010/0081628)

A un matraz de tres bocas de fondo redondo de 12 l se le cargó 6-cloro-2-aminopurina (225,4 g, 1,329 mol). Se añadió terc-BuOH anhidro (4,5 l) y la solución se agitó con un agitador mecánico a temperatura ambiente. Se añadió

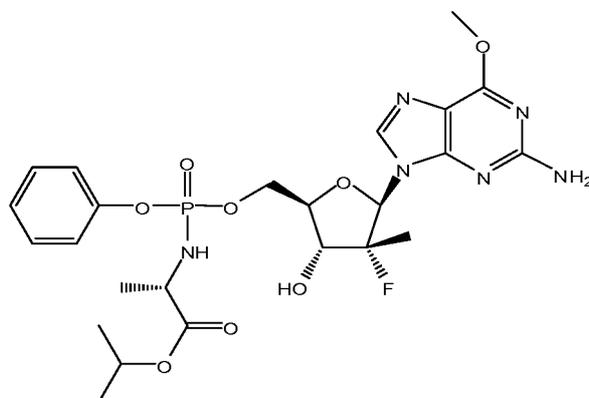
terc-butóxido de potasio (sólido, 151,6 g, 1,35 mol) en porciones en un flujo de gas nitrógeno mientras se agitaba. La mezcla se agitó a TA durante 30 min adicionales. A un matraz de fondo redondo de 5 l se le cargó el  $\alpha$ -bromuro (10, 197 g, 0,451 mol) y 3 l de acetonitrilo anhidro a temperatura ambiente. La solución de bromuro se añadió a la suspensión a base de purina durante 1 min a temperatura ambiente. El matraz de 5 l se aclaró con acetonitrilo (1 l, 2 veces) para transferir el bromuro completamente a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó gradualmente a 50 °C durante 2 h con una manta calefactora y un controlador y se agitó durante 20 h. La reacción estaba casi completa, como se muestra por CCF beta ( $f_R$  0,28, EtOAc al 30 % en hexanos). La reacción se interrumpió mediante la adición de solución sat. de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (200 ml) para formar una suspensión. El sólido suspendido se retiró por filtración a través de un lecho de 3 cm de Celite en un embudo Buchner de porcelana de 2,5 l. El sólido se lavó con tolueno (100 ml, 3 veces). El filtrado combinado se neutralizó mediante la adición de solución 6 N de HCl hasta pH 7 (aprox. 220 ml). La mezcla se concentró a presión reducida. Cuando el volumen de la mezcla se redujo a aproximadamente un tercio del volumen, el sólido precipitado adicional se separó por filtración de una manera similar. El filtrado se concentró adicionalmente hasta un volumen de aproximadamente 800 ml. El residuo se cargó sobre una columna tapón (1,6 kg de gel de sílice de calidad ultrarrápida en un embudo Buchner de vidrio sinterizado de 6 l) y se eluyó (a través de succión) con un gradiente de acetato de etilo al 10 % en hexanos (6 l) para retirar las impurezas no polares, acetato de etilo al 30 % en hexanos para proporcionar una pequeña cantidad de lactol (6 l) y después acetato de etilo al 40 %-45 % en hexanos (4 l) para eluir la cantidad principal de producto. Las fracciones de producto que contenía se combinaron, se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío (0,2 mmHg (2,66 kPa), 24 h, temperatura ambiente) a un sólido de espuma de color blanco (150,7 g,  $\beta/\alpha = 14:1$  por RMN. RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )beta:  $\delta = 1,33$  (d, 22,4 Hz, 2'-C- $\text{CH}_3$ ), alfa: 1,55 (d, 22 Hz, 2'-C- $\text{CH}_3$ ).

La espuma de mezcla de producto se disolvió en metanol (700 ml) a temperatura ambiente. Tras el reposo, se formó un sólido lentamente durante 2 h. La suspensión se enfrió en un congelador a -5 °C durante 17 h. El sólido de color blanco resultante se recogió por filtración y se lavó con MeOH frío (-5 °C, 60 ml, 3 veces) y etil éter (100 ml, 3 veces). El sólido se secó al vacío (0,2 mmHg (2,66 kPa), 24 h, temperatura ambiente) para proporcionar 110,5 g de producto  $\beta$  con excelente de ( $\beta/\alpha$  99,8:1 por HPLC). El filtrado se concentró parcialmente (aprox. 400 ml) y después se diluyó con más MeOH (400 ml) mientras se calentaba a 60 °C. La solución se enfrió a temperatura ambiente, sin semillas y después se enfrió a -5 °C. Se recogió la segunda cosecha, se lavó y se secó de una manera similar para proporcionar más producto en forma de un sólido de color blanco (12,26 g) con una pureza diastereomérica similar. El licor madre se concentró a sequedad a presión reducida (aprox. 25 g). El residuo era una mezcla de  $\beta$  y  $\alpha$  isómeros. Se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice automatizada (Analogix, cartucho de 240 g, acetato de etilo del 40 % al 50 % en hexanos) para proporcionar 14,52 g de espuma de producto que se recristalizó en MeOH, se lavó y se secó de una manera similar para proporcionar 8,46 g adicionales de producto en una alta pureza.

Los tres sólidos se consideraron de pureza similar y se combinaron para proporcionar 131,2 g de producto cristalino de color blanco, (55 % a partir de bromoazúcar, 49 % a partir de lactol). Pf 160,5-162,0 °C. Pureza por HPLC 99,5 % incluyendo un 0,20 % de alfa.

RMN  $^1\text{H}$  (anómero  $\beta$  puro,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,03$  (m, 2H, arom), 7,93 (m, 2H, arom), 7,88 (s, 1H, C8-H), 7,60 (m, 1H, arom.), 7,50 (m, 1H, arom.), 7,44 (m, 2H, arom.), 7,33 (m, 2H, arom.), 6,44 (dd, 1H, C1'-H), 6,12 (d, 1H, C3'-H), 5,35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,00 (dd, 1H, C5'-Ha), 4,76 (m, 1H, C4'-H), 4,59 (dd, 1H, C5'-Hb), 1,33 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### Ejemplo 12: Preparación de Compuesto 12 (del documento US20110015146)



45

12

Síntesis de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-isopropilo

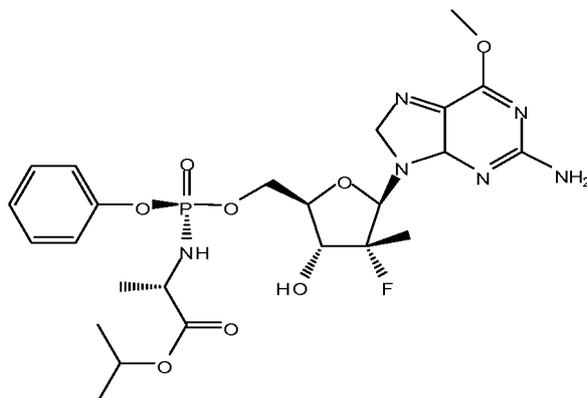
A un matraz de fondo redondo seco de 250 ml se le cargaron diclorofosfato de fenilo (2,66 g, 12,61 mmol) y diclorometano anhidro (40 ml). Se añadió la sal de éster de amino (2,60 g, 15,53 mmol) a la solución y la mezcla se enfrió a -5 °C. Después se añadió rápidamente N-metilimidazol (7,7 ml, 97 mmol) a través de una jeringa seca a -

50

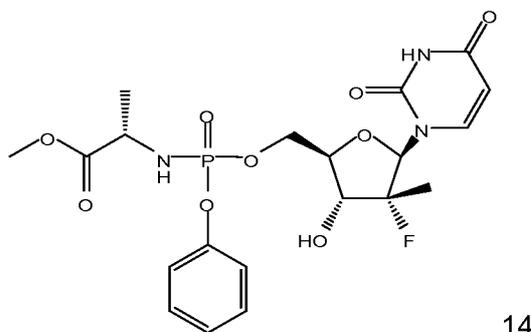
5 °C y la solución se agitó a -5 °C durante 1 h. El nucleósido ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol), 3,04 g, 9,7 mmol) se añadió desde un vial en una porción a -5 °C y el sólido se disolvió lentamente en 20 minutos. Se dejó que la temperatura de reacción se elevara a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 17 h, la reacción no era completa. Se hicieron más reactivos (a partir de fosfato (2,66 g), aminoéster (2,60 g) e N-metilimidazol (3,8 ml, 48 mmol)) y se añadieron a la mezcla de reacción a -5 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas más. La reacción era casi completa, como se muestra por resultado de análisis por CCF y se diluyó con 70 ml de diclorometano. Se añadió solución de HCl (1 N, 70 ml). La capa acuosa se separó y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la retirada del disolvente a presión reducida, el residuo pegajoso se purificó a través de cromatografía en columna automatizada usando un cartucho de 240 g y un gradiente de 2-PrOH al 0-8 % en diclorometano para proporcionar el producto en forma de un sólido de espuma (4,16 g, 7,14 mmol, rendimiento del 73 %). Pureza mediante HPLC del 97,4 %. Los espectros de RMN de producto mostraron que es una mezcla de dos diastereoisómeros con una relación de 1,2:1. RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7,98 (1H, s, 8-H de un isómero), 7,95 (1H, s, 8-H de otro isómero), 7,37-7,32 (2H, m, arom-H), 7,22-7,15 (3H, m, arom-H), 6,6 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 6,11 (1H, d, Cl'-H de un isómero), 6,09 (1H, d, Cl'-H de otro isómero), 6,09-5,98 (1H, m, NH de amida), 5,88 (1H, d, 3'-OH de un isómero), 5,81 (1H, d, 3'-OH de otro isómero), 4,85-4,75 (1H, hepta, metino H de iso-propilo), 4,46-4,27 (2H, m, C<sup>4'</sup>-H, α-H de éster de amino), 4,15-4,07 (1H, m, C<sup>3'</sup>-H), 3,96 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,82-3,72 (2H, m, C<sup>5'</sup>H<sub>a</sub> y C<sup>5'</sup>H<sub>b</sub>), 1,23-1,06 (9H, m, CH<sub>3</sub>'s de éster de amino), 1,03 (3H, d, C<sup>2'</sup>-CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>): 0 = 4,91 (un isómero), 4,72 (otro isómero).

Un método de purificación alternativo es alterar químicamente el subproducto menor 3' fosforamidato con el fin de simplificar la separación cromatográfica. El producto fosforamidato en bruto se disuelve en piridina anhidra (5 ml/g) y se trata con 0,5 equivalentes molares de cloruro de t-butildimetilsililo a temperatura ambiente para reaccionar selectivamente con el hidroxilo libre primario del 5' de la impureza del isómero 3'. El progreso de la reacción puede controlarse mediante CL/EM. Una vez que el isómero 3' se convierte en un derivado de 5'-tBDMS-3'-fosforamidato, la reacción se interrumpe con metanol (3 eq), se concentra a presión reducida, se reparte entre acetato de etilo y ácido cítrico al 5 % y después la capa orgánica se concentra. El residuo se somete a cromatografía que ahora puede hacerse con una carga superior y un gradiente más rápido y puede conseguir una pureza más alta.

### 30 Ejemplo 13: Preparación de Compuesto 13 (documento US20110015146)



### 35 Ejemplo 14: Preparación de Compuesto 14 (del documento US 7.964.580, Ejemplo 5)

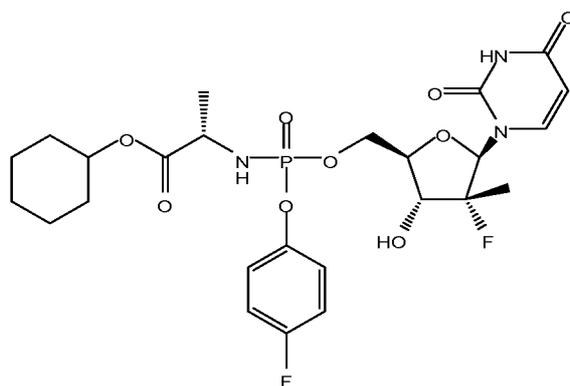


Preparación de metoxi-alanil fosfato de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina-5'-fenilo)

40 Se añadió metoxialanil fosforocloridato de fenilo (1 g, 6,5 eq) disuelto en 3 ml de THF a una mezcla de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (0,15 g, 1 eq) y N-metilimidazol (0,3 g, 8 eq) en 3 ml de THF con agitación vigorosa a

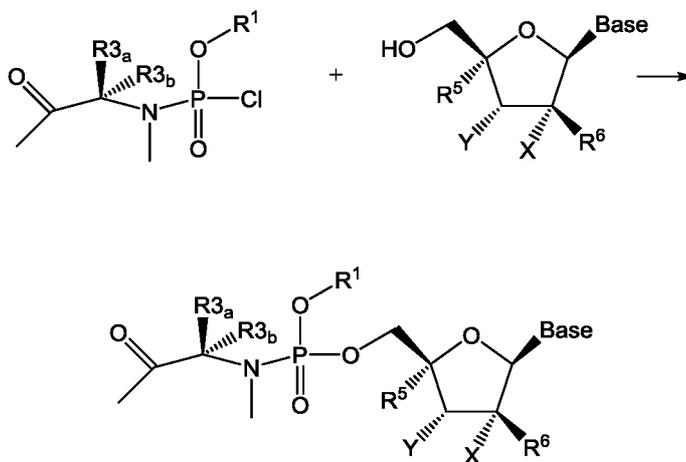
temperatura ambiente, después la reacción se agitó durante la noche. Se eliminó el disolvente mediante presión reducida. El producto en bruto resultante se disolvió en metanol se purificó mediante HPLC preparativa en una columna YMC 25 x 30 x 2 mm usando una fase móvil de gradiente de elución de agua/acetonitrilo. El acetonitrilo y el agua se retiraron a presión reducida para proporcionar el producto deseado (50,1 mg, 15,6 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1,20-1,27 (m, 6H), 3,58 (d, J = 16,0 Hz, 3H), 3,75-3,92 (m, 2H), 4,015-4,379 (m, 2H), 5,54 (t, J = 10,2 Hz, 1H), 5,83-5,91 (m, 1H), 6,00-616 (m, 1H), 7,18 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,35 (t, J = 4,4 Hz, 2H), 7,55 (s, 1H), 11,52 (s, 1H); EM, m/e 502 (M+1)<sup>+</sup>.

**Ejemplo 15: Preparación de Compuesto 15 (Ejemplo 55, del documento US 7.964.580)**



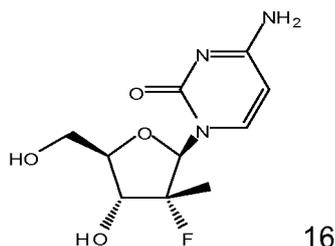
15

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ> 1,20-1,44 (m, 12H), 1,60-1,71 (m, 4H), 3,75-4,02 (m, 2H), 3,94-4,02 (m, 1H), 4,19-4,26 (m, 2H), 4,59-4,61 (m, 1H), 5,57 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 5,85-6,06 (m, 3H), 7,17-7,23 (m, 4H), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 11,50 (s, 1H); EM, m/e 587,92 (M + 1)<sup>+</sup>.



Un procedimiento general para derivados de fosforamido de nucleósidos se publica en la columna 461 del documento US 7.964.580. Una solución del fosforocloridato apropiado (6,5 equivalentes) en tetrahydrofurano anhidro (THF) puede añadirse a una mezcla de nucleósido (1 equivalente) y N-metilimidazol (8 equivalentes) en THF anhidro con agitación vigorosa a temperatura ambiente con la mezcla de reacción agitada durante la noche. El disolvente puede retirarse al vacío y el producto en bruto purificarse mediante cromatografía en columna y/o cromatografía en capa fina preparativa para proporcionar el compuesto deseado.

**Ejemplo 16: Preparación de Compuesto 16 (del documento US 7.429.572)**



16

## Síntesis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina partir de citidina

5 Etapa 1: A una suspensión de citidina (100 g, 0,411 mol) en DMF (2,06 l) se le añade anhídrido benzoico (102,4 g, 0,452 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La DMF se retiró al vacío y el residuo se trituró con éter dietílico. El sólido resultante se recogió mediante filtración por succión y se lavó con éter dietílico (200 ml, 2 veces). El secado adicional al vacío a temperatura ambiente proporcionó la N<sup>4</sup>benzamida (140,6 g, 98,3 %). Una porción de este material (139,3 g, 0,401 mol) se disolvió en piridina anhidra (1,2 l) y se trató con 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (141,4 ml, 0,441 mol) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró casi a sequedad al vacío y se coevaporó con tolueno (200 ml, 3 veces). El residuo se trató con EtOAc (1,8 l) y se lavó con HCl (200 ml, 2 veces, 0,05 N), NaHCO<sub>3</sub> (5 %, 400 ml, 2 veces). La capa orgánica se lavó, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó a sequedad. Se aisló Compuesto 16-1 (Compuesto 4-1 del documento US 7.429.572) (256,5 g, >100 %) en forma de una espuma de color blanco y se usó sin purificación adicional.

15 Etapa 2: Se disolvió Compuesto 16-1 (236,5 g, 0,40 mol) en THF seco (1,22 l). Se añadió DMSO anhidro (180,8 ml, 2,1 mol) y la solución resultante se enfrió a entre -20 °C y -15 °C. Se añadió anhídrido trifluoroacético (90,6 ml, 0,64 mol) gota a gota durante 45 minutos y la solución se agitó entre -20 °C y -15 °C durante 2 horas después de lo cual se añadió trietilamina anhidra (223,5 ml, 1,6 mol) durante 20 min. La reacción en bruto que contenía cetona 16-2 se disolvió en EtOAc (500 ml) y la solución resultante se lavó con H<sub>2</sub>O (400 ml, 3 veces), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y los disolventes se retiraron al vacío para proporcionar un sólido de color amarillo que se purificó en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente en etapas de Et<sub>2</sub>O (0-60 %) en hexanos, seguido de un gradiente en etapas de EtOAc (50-100 %) en hexanos. La cetona en bruto obtenida de este modo (~192 g) se cristalizó en éter de petróleo para proporcionar la cetona 16-2 (Compuesto 4-2 del documento US 7.429.572) (138,91 g, 57,5 % a partir de citidina) en forma de un sólido de color blanco y 22 g de material de partida sin reaccionar, 16-1, en forma de un sólido de color amarillo.

30 Etapa 3: Se disolvió Compuesto 16-2 (48,57 g, 8,26 mmol) en tolueno anhidro (~400 ml) y el disolvente se retiró al vacío con exclusión de humedad. Después, el residuo se secó adicionalmente al vacío (bomba de aceite) durante otras 2 h. Con exclusión de humedad estricta, la espuma residual se disolvió en dietil éter anhidro (1,03 l) en argón. La solución resultante se enfrió a -78 °C en argón y se añadió MeLi (1,6 M, 258,0 ml, 0,413 mol) gota a gota mediante embudo de adición. Después de que la adición fuera completa, la mezcla se agitó durante 2 h a -78 °C. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso 1 M (500 ml) lentamente. Después de calentar a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con H<sub>2</sub>O (500 ml, 2 veces), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y después se concentró a sequedad para proporcionar una espuma de color marrón (-60 g, >100 %).

35 La reacción se realizó dos veces más usando 37,62 g y 56,4 g del compuesto 16-2. Los productos en bruto combinados (128,0 g, 0,212 mol) se disolvieron en THF (1,28 l) y se trataron con HOAc concentrado (23 ml, 0,402 mol). Se añadió a la solución TBAF (384,0 ml, 1M en THF). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0,75 h y la mezcla se trató con gel de sílice (750 g) y se concentró a sequedad. El polvo se colocó en una columna de gel de sílice rellena en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La elución con EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:7 proporcionó un sólido ceroso oscuro que se preadsorbió sobre gel de sílice (300 g) y se cromatografió como antes. Se aisló Compuesto 16-3 (Compuesto 4-3 del documento US 7.429.572) (46,4 g, 53,0 % a partir de 16-2) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, J = 5,4 Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, J = 5,0 Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, J = 5,8 Hz), 7,05 (Ψt, 2H, J = 7,7 Hz), 7,62 (Ψt, 1H, J = 7,3 Hz), 8,00 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 8,14 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>·0,5 H<sub>2</sub>O: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Encontrado: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

50 Etapa 4: Se disolvió compuesto 16-3 (46,0 g, 0,13 mol) en piridina anhidra y se concentró a sequedad al vacío. El jarabe resultante se disolvió en piridina anhidra en atmósfera de argón y se enfrió a 0 °C. con agitación. La solución de color marrón se trató con cloruro de benzoílo (30 ml, 0,250 mol) gota a gota durante 1 min. Se retiró el baño de hielo y la agitación continuó durante 1,5 h por lo que el análisis por CCF no mostró material de partida restante. La mezcla se inactivó mediante la adición de agua (5 ml) y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (500 ml, 1 vez) y H<sub>2</sub>O (500 ml, 1 vez). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se filtró, se concentró a sequedad y se cromatografió en gel de sílice eluyendo con un gradiente por etapas de EtOAc-hexanos (25-60 %) para proporcionar el compuesto 16-4 en forma de una espuma de color amarillo (compuesto 4-4 del documento US 7.429.572) (48,5 g, 67 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, 1H, J = 3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, J = 7,3 Hz). Análisis calculado para C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38.

60 Encontrado: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

Etapa 5: Se disolvió compuesto 16-4 (7,50 g, 0,013 mol) en tolueno anhidro (150 ml) en atmósfera de argón y se enfrió a -20 °C. Se añadió DAST (2,5 ml, 18,9 mmol) lentamente y se retiró el baño de enfriamiento después de que la adición fuera completa.

65 La agitación continuó durante 1 h y la mezcla se vertió en solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) y se lavó hasta

que cesó el desprendimiento de gas. La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc-hexanos 1:1. El rendimiento fue de 1,22 g (16,3 %) de 16-5 puro (Compuesto 4-5 del documento US 7.429.572 en forma de un sólido de color blanco. pf 241 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexanos); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,49 (d, 3H, J = 22,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,64 (dd, 1H, J = 3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, J = 2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, J = 8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, J = 18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (sa, 1H, NH). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,3 (m) Análisis calculado para C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·0,7 H<sub>2</sub>O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Encontrado: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20. Etapa 6: Se suspendió Compuesto 16-5 (6,30 g, 0,011 mol) en amoníaco metanólico (aprox. 7 N, 150 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retiró al vacío, se co-evaporó con metanol (20 ml, 1 vez) y se preadsorbió sobre gel de sílice. El polvo de color blanco se colocó en una columna de gel de sílice (rellenada en CHCl<sub>3</sub>) y la columna se eluyó con EtOH al 9 % en CHCl<sub>3</sub>, después, EtOH al 17 % y por último EtOH al 25 % en CHCl<sub>3</sub>. La concentración de las fracciones que contenían el producto, la filtración a través de un disco de 0,401 mm y la liofilización a partir de agua proporcionó el compuesto 16-6 (Compuesto 4-6 del documento US 7429572), 2,18 g (76 %). RMN <sup>1</sup>H(DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,17 (d, 3H, J = 22,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,63 (dd, 1H, J = 2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (s ap, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, J = 7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, J = 18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7,42 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7,90 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H-6). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,60 (m). Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·1,4 H<sub>2</sub>O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Encontrado: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. El Compuesto 16-6 (0,10 g, 0,386 mmol) se convirtió en la sal de clorhidrato por disolución en agua (2 ml) y el pH se ajustó a aproximadamente 3,0 con HCl 1 M. El agua se retiró al vacío y el residuo se cristalizó en EtOH acuoso para proporcionar 16-6 en forma de la sal de clorhidrato (71,0 mg). pf 243 °C (dec); RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,29 (d, 3H, J = 22,6 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,65 (dd, 1H, J = 2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, J = 17,3 Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>4</sub>): δ 1,69 (m). Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Encontrado: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

## EJEMPLOS BIOLÓGICOS

### Protocolo de ensayo

#### Ensayo de Replicón de alto rendimiento (HTBS, por sus siglas en inglés)

Se sembraron células de replicón que albergaban ARN del VHC H77 (genotipo 1a) o Con1 (genotipo 1b) e indicador luciferasa Renilla en placas de 384 pocillos de color negro a una densidad de  $1,6 \times 10^3$  células por pocillo en 90 µl de medio de cultivo DMEM, con exclusión de G-418. Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO al 100 % y se añadieron a células a una dilución 1:225, logrando una concentración final de DMSO al 0,44 % en un volumen total de 90 µl con una Biotek µFlow Workstation. Se incubaron las placas de células a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3 días, después de lo cual los medios de cultivo se retiraron y las células se sometieron a ensayo para determinar la actividad de la luciferasa como marcador del nivel de replicación. La expresión de luciferasa se midió usando reactivos de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega, Madison, WI). Brevemente, se añadieron 20 µl de tampón de luciferasa Dual-Glo para lisar las células durante 10 min y posteriormente se añadieron 20 µl de un sustrato Dual-Glo Stop & Glo diluido (1:100) a cada pocillo. La señal de luminiscencia se midió en un lector de placas Perkin Elmer Envision después de la incubación durante 10 minutos. Los niveles de luciferasa se convirtieron en porcentajes con respecto a los controles no tratados (definidos como el 100 %) y los datos se ajustaron a la ecuación logística de respuesta a dosis  $y = a/(1+(x/b)^c)$  usando el software XLFit4 (IDBS, Emeryville, CA). Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon a partir de las ecuaciones resultantes. Como alternativa, la actividad antivírica puede analizarse mediante la determinación de la CI<sub>50</sub> de la proteasa NS3 del VHC. La actividad de la proteasa NS3 del VHC se controló usando un sustrato de peptidomimético (RET S1, Anaspec, San Jose, CA) de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) basado en el método de Taliani, Taliani M, Bianchi E, Narjes F, Fossatelli M, Urbani A, Steinkühler C, et al. *A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer peptide substrates. Anal. Biochem.* 1996; 240 (1): 60-7, con respecto a la realización de dicho ensayo.

Brevemente, se preincubaron 2-10 nM de dominios de la proteasa NS3 purificados a 37 °C durante 10 minutos con cofactores del péptido NS4A isogénicos 20 µM (Sigma, San Luis, MO), en tampón de glicerol al 40 % con HEPES 50 mM pH 7,5 y DTT 10 mM. Los compuestos se diluyeron en serie 1:3 en DMSO, se incubaron con la mezcla de enzima/cofactor durante 10 minutos y las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato de RET S1 2 µM (concentración final). El aumento de la fluorescencia se midió continuamente durante una hora usando un lector de placas de fluorescencia Victor3 V (Perkin Elmer, Waltham, MA). Las velocidades iniciales se calcularon para cada concentración de inhibidor usando el software Workout 1.5 (DAZDAQ, Sussex Este, Reino Unido) con el algoritmo de máxima pendiente. Los datos de velocidad se convirtieron en porcentajes con respecto al control sin tratar (definido como el 100 %) y se realizó una regresión no lineal para calcular las concentraciones inhibitorias del 50 % (valores CI<sub>50</sub>).

Potencia enzimática NS3: Se forma un complejo de proteasa NS3 purificada con péptido NS4A y después se incubó con diluciones en serie de los compuestos (DMSO utilizado como disolvente). Las reacciones se inician mediante la adición de sustrato de péptidos doblemente marcados y se mide el aumento cinético resultante en la fluorescencia. Se realiza una regresión no lineal de los datos de velocidad para calcular las CI<sub>50</sub>. La actividad se somete a ensayo

inicialmente contra la proteasa genotipo 1b. Dependiendo de la potencia obtenida contra el genotipo 1b, pueden someterse a ensayo genotipos adicionales (1a, 2a, 3) y/o enzimas resistentes a inhibidores de la proteasa (mutantes D168Y, D168V o A156T). Se usa BILN-2061 como control durante todos los ensayos. Se evaluaron en este ensayo compuestos de los Ejemplos y se descubrió que tenían valores de  $CI_{50}$  de menos de aproximadamente 1  $\mu$ M.

5 Potencia y citotoxicidad del replicón: Se tratan células Huh-Luc (replicón genotipo 1b de Bartenschlager I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET que se replica de forma estable) con diluciones en serie de compuesto (se usa DMSO como disolvente) durante 72 horas. El número de copias de replicón se mide por bioluminiscencia y se realiza una regresión no lineal para calcular las  $CE_{50}$ . Se someten a ensayo placas paralelas tratadas con las mismas diluciones  
10 de fármaco para determinar la citotoxicidad usando el ensayo de viabilidad celular Promega CellTiter-Glo. Dependiendo de la potencia conseguida contra el replicón 1b, los compuestos pueden someterse a ensayo contra un replicón genotipo 1a y/o replicones resistentes a inhibidores que codifican mutaciones D168Y o A156T. Se usa BILN-2061 como control durante todos los ensayos. Se evaluaron en este ensayo compuestos de los Ejemplos y se descubrió que tenían valores de  $CE_{50}$  de menos de aproximadamente 5  $\mu$ M.

15 Efecto de proteínas séricas sobre la potencia del replicón

Se realizan ensayos de replicón en medio de cultivo celular normal (DMEM + FBS al 10 %) complementado con concentraciones fisiológicas de albúmina sérica humana (40 mg/ml) o  $\alpha$ -glicoproteína ácida (1 mg/ml). Se comparan  
20 las  $CE_{50}$  en presencia de proteínas séricas humanas con la  $CE_{50}$  en medio normal para determinar el desplazamiento en número de veces en la potencia.

25 Selectividad enzimática: La inhibición de proteasas de mamíferos, incluyendo la elastasa pancreática porcina, la elastasa leucocitaria humana, la proteasa 3 y la catepsina D, se mide a  $K_m$  para los sustratos respectivos para cada enzima. La  $CI_{50}$  para cada enzima se compara con la  $CI_{50}$  obtenido con la proteasa NS3 1b para calcular la selectividad.

30 Citotoxicidad en células MT4: Se tratan células MT4 con diluciones en serie de 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 una regresión no lineal para calcular la  $CE_{50}$ .

35 Concentración del Compuesto asociada a las células en la  $CE_{50}$ : Se incuban cultivos Huh-luc con el compuesto a concentraciones iguales la  $CE_{50}$ . En varios puntos temporales (0-72 horas), las células se lavan 2 veces con medio frío y se extraen con acetonitrilo al 85 %; también se extrae una muestra del medio en cada punto temporal. Los extractos celulares y el medio se analizan por CL/EM/EM para determinar la concentración molar de los compuestos en cada fracción

40 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  $\mu$ M 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 después se centrifugan y los sobrenadantes recuperados se someten a ensayo en el HPLC/UV. La solubilidad puede calcularse mediante la comparación de la cantidad de compuesto detectado en la solución de ensayo definida en comparación con la cantidad detectada en DMSO a la misma concentración. También se determina la estabilidad de los compuestos después de 1 hora de  
45 incubación en el medio de ensayo a 37 °C.

50 Estabilidad en hepatocitos crioconservados humanos, de perro y de rata: Se incuban cada compuesto durante un máximo de 1 hora en suspensiones de hepatocitos (100  $\mu$ l, 80.000 células por pocillo) a 37 °C. Los hepatocitos crioconservados se reconstituyen en el medio de incubación sin suero. La suspensión se transfiere en placas de 96 pocillos (50  $\mu$ l/pocillo). Los compuestos se diluyen a 2  $\mu$ M en medio de incubación y después se añaden a las 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 puede interrumpirse 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 analizó usando CL/EM/EM. La semivida de desaparición del compuesto en suspensión de hepatocitos se determina ajustando los datos de  
55 concentración-tiempo con una ecuación exponencial monofásica. Los datos también se aumentan a escala para representar la depuración hepática intrínseca y/o el aclaramiento hepático total.

60 Estabilidad en Fracción S9 hepática de ser humano, perro y rata: Se incuban cada compuesto durante un máximo de 1 hora en suspensión S9 (500  $\mu$ l, 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 analizó 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.

65 Permeabilidad al Caco-2: Se mide la permeabilidad tanto directa (A-a-B) como inversa (B-a-A). Se cultivan monocapas de Caco-2 a confluencia en membranas de policarbonato recubiertas con colágeno, microporosas, en

placas de 12 pocillos Costar Transwell®. Los compuestos se dosifican en el lado apical para la permeabilidad directa (A-a-B) y se dosifican en el lado basolateral para la permeabilidad inversa (B-a-A). Las células se incuban a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en un incubador humidificado. Al principio de la incubación, 1 h y 2 h después de la incubación, se toma una alícuota de 200 µl de la cámara receptora y se sustituya con tampón de ensayo recién preparado. La concentración del compuesto en cada muestra se determina con CL/EM/EM. Se calcula la permeabilidad aparente, Pap.

Unión a proteínas plasmáticas: La unión a proteínas plasmáticas se mide por diálisis de equilibrio. Cada compuesto se enriquece en plasma blanco a una concentración final de 2 µM. El plasma con adiciones y el tampón de fosfato se colocan en lados opuestos de las células de diálisis montadas, que después se hacen girar lentamente en un baño de agua a 37 °C. Al final de la incubación, se determina la concentración del compuesto en plasma y tampón de fosfato. El porcentaje no unido se calcula usando la siguiente ecuación:

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

Donde C<sub>f</sub> y C<sub>b</sub> son concentraciones libres y unidas determinadas como las concentraciones de tampón y plasma después de la diálisis, respectivamente.

Perfiles de CYP450: Cada compuesto se incubaba con cada una de 5 enzimas CYP450 recombinantes humanas, incluyendo CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C19 en presencia y en ausencia de NADPH. Las muestras seriadas se pueden tomar de la mezcla de incubación al comienzo de la incubación y a los 5, 15, 30, 45 y 60 min después del comienzo de la incubación. La concentración del compuesto en la mezcla de incubación se determina mediante CL/EM/EM. El porcentaje del compuesto que permanece después de la incubación en cada punto temporal se calcula mediante la comparación con la toma de muestras en el inicio de la incubación.

Estabilidad en plasma de rata, perro, mono y ser humano: Se incuban compuestos durante un máximo de 2 horas en plasma (de rata, perro, mono o ser humano) a 37 °C. Los compuestos se añaden al plasma a concentraciones finales de 1 y 10 µg/ml. Las alícuotas se toman 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min después de la adición del compuesto. La concentración de compuestos y metabolitos principales en cada punto temporal se mide por CL/EM/EM. Se determinan datos biológicos (potencia antivírica [CE<sub>50</sub>]) usando un ensayo de indicador de replicón del VHC a base de luciferasa de *Renilla* (Rluc) – Rluc del VHC 1b).

#### Ejemplo biológico 7: Resistencia cruzada del Compuesto 10 y el Compuesto 6

Este estudio se realizó para determinar los perfiles de resistencia cruzada *in vitro* del Compuesto 10 y el Compuesto 6. Un panel de replicones mutantes del VHC que llevaban el distintivo mutación S282T de resistencia a fármacos del nucleósido NS5B del VHC o las mutaciones de resistencia a fármacos del NS5A del VHC más habituales *in vitro* e *in vivo*, se investigó por medio de un ensayo de replicón transitorio para determinar si existe resistencia cruzada entre mutaciones que confieren susceptibilidad reducida al Compuesto 10 o al Compuesto 6. No se observó resistencia cruzada entre estos compuestos con replicones mutantes S282T, que permanecieron totalmente susceptibles al Compuesto 6 y mutantes NS5A que no muestran ninguna susceptibilidad reducida al Compuesto 10.

#### **Materiales y Métodos**

45 Reactivos

Los compuestos

Se sintetizaron el Compuesto 6 y el Compuesto 10 en Gilead Sciences, Inc. en Foster City, CA.

50

Estirpes celulares

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

Se usó PI-hRluc, un replicón bicistrónico que codifica el gen de la luciferasa de *Renilla* corriente abajo del IRES de la polio y genes no estructurales de VHC genotipo 1b (cepa Con-1) (NS3-NS5B) corriente abajo del IRES del de la VEMC, para los estudios de transfección transitoria. El plásmido PPI-hRluc se generó a partir del plásmido pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET, que codifica un replicón subgenómico genotipo 1b (cepa Con-1) y se obtuvo de ReBLikon (Friebe et al., *J Virol.*, 2001; 75 (24): 12047-57). El gen hRluc se amplificó por PCR a partir de Flexi hRluc-neo de CMV PF9 (R) (Promega, Madison, WI) por PCR usando AccuPrime Super Mix I (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los cebadores

PV\_Rluc\_Top y 3'-Rluc (NotI). Estos dos cebadores tienen las siguientes secuencias y llevan sitios de restricción para la clonación posterior: PV\_Rluc\_Top: 5' ATC AGA CAA TTG TAT CAT AAT GGC TTC CAA GGT GTA CG 3' (SEQ ID NO: 3); 3'-Rluc(NotI): 5' ACG TCA CTA TCT ACG CGG CCG CTT ACT GCT CGT TCT TC3' (sitio NotI subrayado) (SEQ ID NO: 4). Los IRES del promotor T7, 5'UTR y el virus de la polio se amplificaron por PCR a partir del plásmido pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET usando los cebadores 5'-P7 (SbfI) y PV\_Rluc\_Bottom. Estos dos cebadores tienen las siguientes secuencias y llevan sitios de restricción para la clonación posterior: 5'-P7(SbfI): 5' CAA GCT AAG CTG CCT GCA GG T 3' (sitio SbfI subrayado) (SEQ ID NO: 5); PV\_Rluc\_Bottom: 5' CGT ACA CCT TGG AAG CCA TTA TGA TAC AAT TGT CTG AT (SEQ ID NO: 6). Los fragmentos posteriores de la PCR de las dos reacciones anteriores después se unieron entre sí usando PCR solapada y los cebadores 5'-P7 (SbfI) y 3'-Rluc (NotI). El producto de amplificación completado P7-5'UTR-IRES del virus de la polio-hRluc se subclonó en pCR2.1-TOPO. El plásmido resultante se digirió con SbfI y NotI y el fragmento escindido (P7-5'UTR-IRES del virus de la polio-hRluc) se ligó usando ADN ligasa T4 en pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET digerido con las mismas enzimas. El vector resultante, pPI-hRluc, se secuenció para confirmar la orientación y la secuencia correctas de la región P7-5'UTR-IRES del virus de la polio-hRluc del plásmido.

Se han descrito replicones GT 1a y 2a que contienen hRluc previamente (Robinson M, Yang H, Sun SC, Peng B, Tian Y, Pagratis N, et al. *Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a. Antimicrob Agents Chemother* 2010).

El replicón PI-hRluc se usó como estructura principal para la construcción de una quimera. Se hizo una delección interna en NS5B volviéndolo deficiente en la replicación. Los últimos 413 pares de bases (que codifican los últimos 137 aminoácidos de NS5A) de NS5A 1b-con-1 se sintetizaron en marco con secuencias de NS5B de los genotipos 2b, 3a, 4a, 5<sup>a</sup> y 6a (Genscript Inc. Piscataway NJ). Se derivaron secuencias de NS5B consenso para cada uno de estos genotipos mediante la alineación de las secuencias depositadas en la base de datos europea del VHC y la extracción de un consenso. Estas secuencias de consenso novedosas para NS5B, así como las secuencias derivadas de aislados clínicos individuales (Herlihy et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (10): 3523-31) se usaron para construir los replicones quiméricos NS5B. Se usó un sitio XhoI único en el extremo 5' y un sitio AseI único en el extremo 3' para clonar direccionalmente en el vector de NS5B 1b-hRluc/NeoR a través de técnicas de biología molecular convencionales.

A las mutaciones S282T de NS5B se les introdujeron plásmidos de replicón usando el kit de mutagénesis QuikChange II XL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). Se secuenció todo el replicón mutado para confirmar la presencia de la mutación S282T y la ausencia de cualquier mutación de sitio secundaria.

Se crearon replicones mutantes de NS5A mediante la síntesis de una secuencia que codifica los primeros 149 aminoácidos de NS5A que contienen la mutación deseada flanqueada por un sitio BsrGI y EcoRI 5' y 3', respectivamente (Genscript, Piscataway, NJ). Después, los fragmentos sintetizados se clonaron mediante técnicas de biología molecular convencionales en un plásmido de replicón 1a Rluc modificado para permitir la clonación en sitios de restricción BsrGI y EcoRI únicos. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de ADN.

Los replicones se linealizaron usando las siguientes enzimas: Spe I (replicones a base de Rluc PI 1b), Hpa I (replicones a base de 1a-Rluc) y XbaI/HpaI (replicón 2a Rluc). Se transcribieron los ARN de los replicones *in vitro* a partir de plásmidos de codificación de replicones usando un kit de transcripción *in vitro* T7 Ribomax (Promega; Madison, WI) seguido de purificación usando una columna RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA).

## Ensayos

Determinación de susceptibilidad a fármacos usando un ensayo de replicón de transfección transitoria

Se transfectó ARN en células Huh-Lunet usando el método de Lohmann et al. (Lohmann et al, *Science* 1999; 285 (5424): 110-3). Brevemente, las células se tripsinizaron y se lavaron dos veces con PBS. Una suspensión de  $4 \times 10^6$  células en 400  $\mu$ l de PBS se mezcló con 5  $\mu$ g de ARN y se sometieron a electroporación usando los ajustes de 960  $\mu$ F y 270 V. Las células se transfirieron a 40  $\mu$ l de medio de cultivo precalentado y después se sembraron en placas de 96 pocillos o de 384 pocillos. Los Compuestos se diluyeron en serie con factor de dilución 3 en DMSO al 100 % y se añadieron a las células para conseguir una concentración final de DMSO del 0,5 %. Las células se trataron durante tres días después de lo cual se retiraron los medios de cultivo, se lisaron las células y se cuantificó la actividad de la luciferasa de Renilla usando reactivos disponibles en el mercado (Promega) y un instrumento Victor o Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Análisis de los datos

Los datos se convirtieron en porcentajes con respecto a los controles no tratados (definidos como el 100 %), y se calcularon los valores de CE<sub>50</sub> mediante regresión no lineal de dos conjuntos de datos duplicados el usando software GraphPad Prism o Pipeline Pilot. Se calcularon los factores de cambio de la resistencia como la relación de CE<sub>50</sub> del replicón mutante con respecto al de tipo silvestre.

**Resultados**

Actividad del Compuesto 10 y del Compuesto 6 contra S282T

- 5 La selección de resistencia in vitro anterior con el Compuesto 10 ha identificado uniformemente S282T en NS5B como mutación primaria en múltiples genotipos (GT 1b, 1a y 2a). La mutación S282T de NS5B se introdujo posteriormente en replicones GT 1a, 1b y 2a de longitud completa y replicones quiméricos que contenían una secuencia de NS5B 2b, 3a o 4a clonada en una estructura principal de GT1b. La susceptibilidad al Compuesto 10, el Compuesto 6 y la ribavirina (RBV) se evaluó usando un ensayo de replicación transitoria. La mutación S282T mostró una susceptibilidad reducida al Compuesto 10 con valores de CE<sub>50</sub> en los cinco genotipos que variaron de 117,1 nM a 346,1 nM. El aumento en número de veces en la CE<sub>50</sub> para S282T varió de 2,4 a 16,0 en comparación con el de tipo silvestre a partir de los genotipos correspondientes que mostraron una disminución de la susceptibilidad del replicón al Compuesto 10 cuando está presente la mutación S282T de NS5B.
- 10
- 15 Para el replicón de tipo silvestre, los valores CE<sub>50</sub> para RBV también fueron similares en los cinco genotipos sometidos a ensayo siendo la CE<sub>50</sub> más baja contra GT 2b. Curiosamente, los valores CE<sub>50</sub> para replicones de S282T fueron de 5 a 10 veces más sensibles al tratamiento con RBV que sus correspondientes de tipo silvestre para los cinco genotipos. No se observaron diferencias significativas en las CE<sub>50</sub> del Compuesto 6 entre los replicones de tipo silvestre y S282T lo que indica que esta mutación no altera la susceptibilidad al Compuesto 6. En conclusión, mientras el replicón S282T confirió susceptibilidad reducida al Compuesto 10, el replicón mutante demostró sensibilidad de tipo silvestre al Compuesto 6 y un aumento de la susceptibilidad a la inhibición por RBV superior a la del tipo silvestre.
- 20

**Tabla 7.1. Actividad antivírica del Compuesto 10 y RBV contra mutante de tipo silvestre y S282T de GT1b, 2a, 2b, 3a y 4a**

25

Replicón	Compuesto10			RBV			Compuesto 6		
	CE <sub>50</sub> nM <sup>a</sup>		Factor de cambio <sup>b</sup>	CE <sub>50</sub> nM <sup>a</sup>		Factor de cambio <sup>b</sup>	CE <sub>50</sub> nM <sup>a</sup>		Factor de cambio <sup>b</sup>
	TS	S282T		TS	S282T		TS	S282T	
GT1b	21,5	189,2	8,8	6,6	1,6	0,2	0,5	0,4	0,8
GT2a	146,8	346,1	2,4	8,3	0,6	0,1	5165	2336	0,5
GT2b	13,3	215,6	16,2	2,6	0,6	0,2	0,5	0,5	0,9
GT3A	33,9	117,1	3,5	6,7	1,0	0,2	0,4	0,2	0,6
GT4a	35,8	217,5	6,1	6,2	0,6	0,1	0,5	0,4	0,8

<sup>a</sup> CE<sub>50</sub> indica un promedio para dos o más experimentos independientes.  
<sup>b</sup> Factor de cambio con respecto al tipo silvestre correspondiente

Actividad del Compuesto 10 y el Compuesto 6 contra mutantes de NS5A

- 30 Para determinar si las mutaciones de resistencia a fármacos de NS5A son resistentes de forma cruzada al Compuesto 10, se sometió a ensayo un panel de replicones mutantes de NS5A para determinar la susceptibilidad tanto al Compuesto 6 como al Compuesto 10. Los siete mutantes de NS5A mostraron una susceptibilidad reducida al Compuesto 6 con un aumento de la CE<sub>50</sub> que varió de 25 a 3029 veces. Por el contrario, no se observó ningún cambio significativo en la CE<sub>50</sub> para los mutantes de NS5A con respecto al Compuesto 10 o a un control de RBV.

**Tabla 7.2 Actividad in vitro del Compuesto 10 o el Compuesto 6 contra mutantes de NS5A en el genotipo 1a**

Compuesto	Factor de cambio en la CE <sub>50</sub> (CE <sub>50</sub> de DRM/CE <sub>50</sub> de 1a-H77)						
	M28T	Q30H	Q30R	Q30E	L31M	Y93C	Y93H
Compuesto 6	25	73	170	997	140	327	3029
Compuesto 10	0,9	1,0	0,8	1,0	1,1	ND	0,7
RBV	0,4	0,7	0,8	0,8	0,5		1,0

**Conclusiones**

- 40 En este ejemplo, los perfiles de resistencia cruzada del Compuesto 10 y el Compuesto 6 se evaluaron usando replicones del VHC transitorios que codifican mutaciones de resistencia conocidas en NS5A y NS5B confiriendo susceptibilidad reducida al Compuesto 6 y al Compuesto 10, respectivamente. Los replicones S282T de NS5B confirieron susceptibilidad reducida al Compuesto 10, mientras que no hubo diferencias significativas en las CE<sub>50</sub> del Compuesto 6 medidas a partir de replicones de tipo silvestre y S282T. Recíprocamente, mutaciones que confieren susceptibilidad reducida al Compuesto 6 permanecieron sensibles al tratamiento con el Compuesto 10.

- 45 En general, estos resultados indican que las mutaciones de resistencia para el Compuesto 10 y el Compuesto 6 no muestran una resistencia cruzada y apoyan el uso de estos compuestos en una futura terapia de combinación para

el tratamiento del VHC.

#### Ejemplo biológico 8: Actividad de combinación

- 5 Se muestran datos estudio de combinación del Compuesto 10 con el Compuesto 6 inhibidor de NS5A, los inhibidores no nucleosídicos Compuesto 1 o Compuesto 5, el inhibidor de la proteasa Compuesto 3 o ribavirina (RBV), para un ensayo de replicón in vitro que sigue siendo el patrón para evaluar la actividad antivírica en células de inhibidores del VHC. Estos resultados indicaron que el Compuesto 10 tiene una actividad antivírica aditiva cuando se combina con el Compuesto 6, el Compuesto 1, Compuesto 5 o el Compuesto 3. Además, el Compuesto 10 demostró una sinergia de menor importancia en combinación con RBV in vitro.

#### **Materiales y métodos**

Estirpe celular y cultivo celular

- 15 La estirpe celular de replicón de VHC genotipo 1a utilizada en este estudio se describió anteriormente (Robinson M, Yang H, Sun SC, Peng B, Tian Y, Pagratis N, et al. *Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a. Antimicrob Agents Chemother* 2010). Las células se cultivaron en medio de cultivo celular que contenía medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con Glutamax (Gibco, Carlsbad, CA, N.º del catálogo 10569-044), complementado con FBS al 10 % (Hyclone, Logan, UT, N.º del catálogo SH30071.03), 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, Carlsbad, CA, N.º del catálogo 15140-122) y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco, Carlsbad, CA, N.º del catálogo 11140-050). Se mantuvieron células de replicón en geneticina 0,5 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, N.º del catálogo 10131-035) para prevenir la pérdida de replicón de VHC. Las células se sometieron a pases cada 3-4 días antes de llegar a la confluencia.

- 25 Ensayo de Replicón de VHC para determinaciones de  $CE_{50}$ ,  $CC_{50}$  y estudios de combinación

- 30 Todos los compuestos se suministraron en DMSO al 100 %. Se realizaron diluciones en serie de los compuestos DMSO al 100 %. Todas las diluciones en serie se realizaron en placas de polipropileno de 384 pocillos (Thermo Scientific, Hudson, NH, N.º del catálogo 4341) usando una Biomek FX Workstation. Para las determinaciones de  $CE_{50}$  y  $CC_{50}$ , los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en diez etapas de diluciones 1:3 en las columnas 3-20 de las placas de 384 pocillos. Para los estudios combinacionales, se diluyó en serie un compuesto en nueve etapas de diluciones 1:2 en dirección horizontal con el otro compuesto diluido en serie en siete etapas de diluciones 1:2 en dirección vertical. Esto consiguió un conjunto definido de diferentes concentraciones y proporciones de fármaco. Para cada fármaco individual, el valor de  $CE_{50}$  se seleccionó como el punto medio para el intervalo de concentración sometido a ensayo. Todas las diluciones en serie se realizaron por cuadruplicado por compuesto en la misma placa de 384 pocillos. Se añadió DMSO al 100 % a la columna 1-2 de cada placa de 384 pocillos de dilución en serie. Se añadió un inhibidor de la proteasa del VHC ITMN-191 a 100 µM a la columna 23 como control del 100 % de inhibición de la replicación del VHC, mientras que se añadió puromicina a 10 µM a la columna 24 como control del 100 % de citotoxicidad.

- 45 A cada pocillo de una placa de poliestireno de color negro de 384 pocillos (Greiner Bio-One, Monroe, NC, N.º del catálogo 781086, tratada para cultivo celular), se le añadieron 90 µl de medio de cultivo celular (sin geneticina) que contenía 2000 células de replicón de VHC suspendidas con una Biotek µFlow Workstation. Para la transferencia de compuestos en placas de cultivo celular, se transfirieron 0,4 µl de solución de compuesto desde la placa de dilución en serie del compuesto a la placa de cultivo celular en un Biomek FX Workstation. La concentración de DMSO en los pocillos de ensayo finales era del 0,44 %. Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % y una humedad del 85 %.

- 50 El ensayo de replicón de VHC era un ensayo múltiple que podía evaluar tanto la citotoxicidad como la actividad antireplicón a partir del mismo pocillo. El ensayo de  $CC_{50}$  se realizó en primer lugar. El medio de la placa de cultivo celular de 384 pocillos se aspiró y los pocillos se lavaron cuatro veces con 100 µl de PBS 1 X cada vez, usando un lavador de placas Biotek ELX405. Se añadió un volumen de 50 µl de una solución que contenía calceína AM 400 nM (Anaspec, Fremont, CA, N.º del catálogo 25200-056) en PBS 1 X a cada pocillo de la placa con un Biotek µFlow Workstation. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de que se midiera la señal de fluorescencia (excitación 490 nm, emisión 520 nm) con un lector de placas Perkin Elmer Envision.

- 60 El ensayo de  $EC_{50}$  se realizó en los mismos pocillos que el ensayo de  $CC_{50}$ . La solución de calceína-PBS en la placa de cultivo celular de 384 pocillos se aspiró con un lavador de placas Biotek ELX405. Se añadió un volumen de 20 µl de tampón de luciferasa Dual-Glo (Promega, Madison, WI, N.º del catálogo E298B) a cada pocillo de la placa con un Biotek µFlow Workstation. La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió un volumen de 20 µl de una solución que contenía una mezcla 1:100 de sustrato Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, N.º del catálogo E313B) y tampón Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, N.º del catálogo E314B) a cada pocillo de la placa con un Biotek µFlow Workstation. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que se midiera la señal de fluorescencia con un lector de placas Perkin Elmer Envision.

Análisis de datos

El efecto de la citotoxicidad se determinó mediante la conversión de calceína AM en un producto fluorescente. El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la ecuación 1:

5

$$\% \text{ de citotoxicidad o \% de inhibición} = 100 \times \left(1 - \frac{X_C - M_B}{M_D - M_B}\right) \quad (1)$$

donde  $X_C$  es la señal de fluorescencia del pocillo tratado con compuesto;  $M_B$  es la señal de fluorescencia promedio de los pocillos tratados con puromicina;  $M_D$  es la señal de fluorescencia promedio de los pocillos tratados con DMSO. La actividad de replicación antiVHC se determinó mediante la señal de luminiscencia generada a partir del informador de luciferasa de renilla del replicón del VHC. El porcentaje de inhibición en el replicón del VHC se calculó usando la ecuación 1, donde  $X_C$  es la señal de luminiscencia del pocillo tratado con compuesto;  $M_B$  es la señal de luminiscencia promedio de los pocillos tratados con ITMN-191;  $M_D$  es la señal de luminiscencia promedio de los pocillos tratados con DMSO.

10

15

Los valores  $CC_{50}$  se determinaron como la concentración de compuesto de ensayo que provocó una disminución del 50 % de la viabilidad celular. Los valores de  $CE_{50}$  se determinaron como la concentración de compuesto de ensayo que provocó una disminución del 50 % en la replicación del VHC. Los valores tanto de  $CC_{50}$  como de  $CE_{50}$  se obtuvieron usando el paquete de software Pipeline Pilot 5.0 (Accelrys, San Diego, CA) mediante ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación 2:

20

$$y = d + \frac{a - d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]} \quad (2)$$

donde  $y$  es el % de inhibición observado de replicón de VHC a una concentración  $x$  de Compuesto;  $d$  es la respuesta estimada a la concentración de compuesto cero;  $a$  es la respuesta estimada a la concentración de compuesto infinita;  $c$  es la concentración de la mitad del intervalo ( $CC_{50}$  o  $CE_{50}$ );  $b$  es el factor de pendiente de Hill.

25

Los datos experimentales del estudio de combinación se analizaron usando el programa MacSynergy II desarrollado por Prichard y Shipman (Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr. MacSynergy™ II, versión 1.0. Universidad de Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993). El software (MacSynergy™ II, Universidad de Michigan, MI) calcula la inhibición teórica presuponiendo una interacción aditiva entre los fármacos (basada en el modelo de Independencia de Bliss) y cuantifica diferencias estadísticamente significativas entre los valores de inhibición teóricos y los observados. El trazado de estas diferencias en tres dimensiones da como resultado una superficie en la que las elevaciones en el plano Z representan la sinergia antivírica y las depresiones representan el antagonismo antivírico entre compuestos. Los volúmenes calculados de las desviaciones de superficie se expresan en % en  $\mu M^2$ . Por Prichard y Shipman, efectos de combinación se definen como:

30

35

- Sinergia fuerte: > 100 % en  $\mu M^2$
- Sinergia moderada: > 50 y  $\leq$  100 % en  $\mu M^2$
- Sinergia menor: > 25 y  $\leq$  50 % en  $\mu M^2$
- Aditividad:  $\leq$  25 y > -25 % en  $\mu M^2$
- Antagonismo menor:  $\leq$  -25 y > -50 % en  $\mu M^2$
- Antagonismo moderado:  $\leq$  -50 y > -100 % en  $\mu M^2$
- Antagonismo fuerte:  $\leq$  -100 % en  $\mu M^2$

45

50

Para cada estudio de combinación, se realizaron tres experimentos independientes con cuatro repeticiones en cada experimento.

55 **Resultados**

Actividad antivírica y citotoxicidad de los Compuestos individuales en el ensayo de replicón del VHC genotipo 1a

La actividad anti-VHC y la citotoxicidad del Compuesto 10 en combinación con otros compuestos anti-VHC se sometieron a ensayo en células Huh-7 que llevaban un replicón de VHC genotipo 1a. Los valores de  $CE_{50}$  y  $CC_{50}$

60

para todos los compuestos se enumeran en la siguiente Tabla. No hay ninguna citotoxicidad significativa observada para todos los compuestos individuales hasta las concentraciones más altas sometidas a ensayo en el ensayo de combinación.

5 **Tabla 8.1. CE<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de los Compuestos utilizados en este estudio contra el replicón del VHC genotipo 1a**

Compuestos	Clase	CE <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)
Compuesto 10	Profármaco nucleosídico de NS5B	39	<82446
Compuesto 6	Inhibidor de NS5A	0,032	<44400
Compuesto 1	No nucleósido de NS5B	18	<44400
Compuesto 5	No nucleósido de NS5B	14	<44400
Compuesto 3	Inhibidor de la proteasa NS3	46	<22200
RBV	Análogo de nucleósido	33626	<88800

a Los valores son medias geométricas para tres o más experimentos independientes

Actividad antivírica y citotoxicidad del Compuesto 10 en combinación con otras clases de agentes anti-VHC.

10 Los efectos antivíricos del Compuesto 10 en combinación con otros Compuestos anti-VHC se evaluaron usando el replicón del VHC genotipo 1a. Los resultados se analizaron usando MacSynergy II, que proporciona representaciones gráficas de la superficie que muestran desviaciones significativas de la aditividad. Se resumen volúmenes de sinergia y antagonismo (% en  $\mu\text{M}^2$ ) calculados a partir de las desviaciones de la superficie aditiva en la siguiente Tabla. A un intervalo de confianza del 95 %, los volúmenes medios de sinergia y antagonismo fueron de entre 25 y -25 % en  $\mu\text{M}^2$  cuando el Compuesto 10 se combinó con el Compuesto 6, el Compuesto 1, el Compuesto 5 o el Compuesto 3 indicativos de la interacción aditiva con el Compuesto 10. Además, el Compuesto 10 muestra un volumen de sinergia en el intervalo de 25 a 50 % en  $\mu\text{M}^2$  cuando se combina con RBV, lo que indica una interacción sinérgica menor. En estudios de combinación usando antivíricos de acción directa con el Compuesto 10, la viabilidad celular fue superior al 93 % en las concentraciones más altas de combinaciones de compuestos sometidas a ensayo mientras que los estudios que analizaron los efectos combinados del Compuesto 10 y RBV mostraron una viabilidad celular superior al 85 % en las concentraciones más altas de fármacos combinados.

**Tabla 8.2. Cuantificación de la sinergia y el antagonismo antivirales e interacciones de fármacos para combinaciones de fármacos con el Compuesto 10**

Compuesto utilizado en combinación con el Compuesto 10	Clase	Volumen de sinergia (nM <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Volumen de antagonismo (nM <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Interacción
Compuesto 6	Inhibidor de NS5A	3,3 ± 4,2	-7,7 ± 13,3	Aditiva
Compuesto 1	No nucleósido de NS5B	4,7 ± 8,1	-11,7 ± 10,0	Aditiva
Compuesto 5	No nucleósido de NS5B	1,3 ± 2,3	-5,7 ± 9,0	Aditiva
Compuesto 3	Inhibidor de la proteasa NS3	1,0 ± 1,7	-3,0 ± 4,4	Aditiva
RBV	Análogo de nucleósido	35,3 ± 3,2	-2,0 ± 2,0	Sinergia menor

a Los valores representan la media ± la desviación típica de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado

25 **Tabla 8.3. Cuantificación de la citotoxicidad en combinaciones de Compuestos**

Compuesto utilizado en combinación con el Compuesto 10	Concentración más alta de Compuesto utilizada con la concentración más alta (320 nM) de Compuesto 10	Citotoxicidad a la concentración más alta de combinaciones de compuestos (% de inhibición del crecimiento celular)
Compuesto 6	0,16 nM	5,0 ± 5,0
Compuesto 1	120 nM	7,0 ± 4,6
Compuesto 5	64 nM	4,3 ± 2,9
Compuesto 3	240 nM	2,0 ± 3,5
RBV	16000 nM	14,0 ± 4,4

a Los valores representan la media ± la desviación típica de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado

### Conclusiones

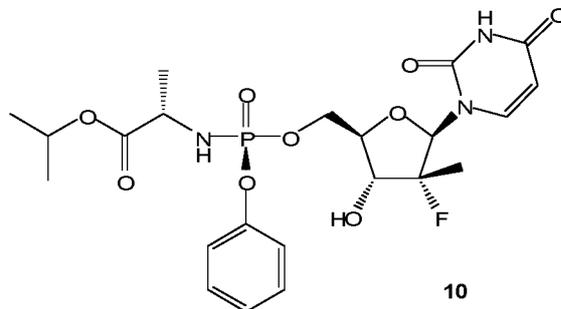
5 La actividad antivírica del Compuesto 10 se sometió a ensayo en combinación con el Compuesto 6, el Compuesto 1, el Compuesto 5, el Compuesto 3 o RBV. El Compuesto 10 mostró una actividad antivírica aditiva en combinación con el Compuesto 6, el Compuesto 1, el Compuesto 5 o el Compuesto 3 y una sinergia menor con RBV.

10 En resumen, estos hallazgos apoyan el potencial de que el Compuesto 10 se use en combinación con el Compuesto 6, el Compuesto 1, el Compuesto 5, el Compuesto 3 o RBV para conseguir una supresión vírica potenciada sin reducir la eficacia de ninguno de los fármacos individuales.

Aunque en el presente documento se ilustran y se describen en detalle realizaciones específicas de la presente invención, la invención no se limita a las mismas. Las descripciones detalladas anteriores se proporcionan como ejemplos de la presente invención y no deben interpretarse como que constituyen ninguna limitación de la invención.

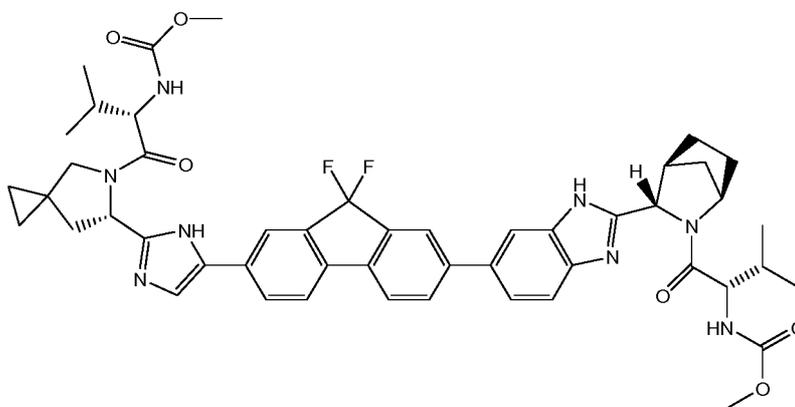
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende: 1) compuesto 10



5

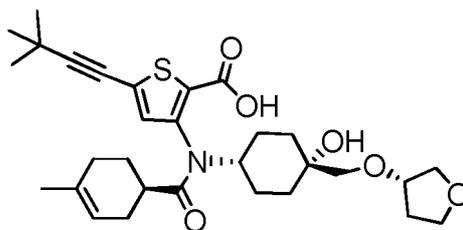
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y 2) compuesto 6



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el compuesto 5



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende adicionalmente uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

4. La composición de la reivindicación 3 que está formulada como una forma de dosificación unitaria para la administración una vez al día.

5. La composición de las reivindicaciones 3 o 4 que está formulada para la administración oral; opcionalmente, que está formulada en forma de un comprimido.

6. Una composición como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en terapia médica.

7. Una composición como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por VHC.

8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 que no es para la administración con un interferón.

9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 que es para la administración con ribavirina.