CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 -
BOGOTA 8, COLOM

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00024874 00000001 Folios: 159
Fecha (AMD): 2000-07-04 16:43:10
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 365 COMPLEM
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

-3611
-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

Referencia : Expediente No. 00.024.874

Solicitante : **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.**

Asunto : Solicitud de patente para: **"PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C"**

Fecha de solicitud : 05 de abril de 2000

TRAMITE: 002 - EVENTO: 001 - ACTUACION: 009

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado de la solicitud en referencia, atentamente presento con este escrito la copia certificada de la solicitud de patente estadounidense No. 60/128,011 del 06 de abril de 1999, junto con la traducción de su descripción, reivindicaciones y certificaciones de la cual se reclama prioridad en esta solicitud de patente.

2. Ruego a la Señora Jefe se sirva aceptar este escrito con sus anexos, y se continúe con el trámite de la solicitud.

Bogotá, - 4 JUL. 2000
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 11041-801-005-1
MRE-29

~~101~~
176

PA 204649

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 07, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: *60/128,011*
FILING DATE: *April 06, 1999*

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. LAWRENCE
Certifying Officer

04/06/99 JC648 U.S. PTO

A/PROV

182
177

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53 (b)(2)

04/08/99 JC541 U.S. PTO 60/128011

Docket: 13/076PV Number		Type a plus sign (+) inside this box	+

INVENTORS(S)/APPLICANT(S)

LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)
TSANTRIZOS	YOULA	S.	Saint-Laurent, Quebec, Canada

TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

MACROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE HEPATITIS C VIRUS

CORRESPONDENCE ADDRESS

Dr. R.P. Raymond
Boehringer Ingelheim Corp.
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368
Ridgefield

STATE	Connecticut	ZIP CODE	06877	COUNTRY	USA

ENCLOSED APPLICATION PARTS *(check all that apply)*

☒ Specification	Number of Pages	77	☐	Small Entity Statement	
☐ Drawing(s)	Number of Sheets		☐	Other (specify)	

METHOD OF PAYMENT *(check one)*

☐	A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fee	PROVISIONAL FILING FEE AMOUNT ($)	$150.00
☒	The Commissioner is hereby authorized to charge the filing fee and credit Deposit Account Number 02-2955 A duplicate copy of this request is enclosed for the convenience of the Assistant Commissioner.		

The Invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.
☐ Yes, the Name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE: _____ Date: April 6, 1999

TYPED or PRINTED NAME: Anthony Bottino Registration No.: 41,629 *(if appropriate)*

☐ Additional inventors are being named on separately numbers sheets attached hereto.

PROVISIONAL APPLICATION FILING ONLY

Burden Hour Statement: This form is estimated to take .2 hours to complete. Time will vary depending upon the need of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Office of Assistance Quality and Enhancement Division, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231 and to the Office of Information and Regulatory Affairs, Office of Management and Budget (Project 0651-00XX), Washington, DC 20503. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, DC 20231

MACROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE HEPATITIS C VIRUS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to compounds, compositions, the preparation of such compounds and methods for the treatment of hepatitis C virus (HCV) infection. In particular, the present invention provides novel peptide analogues, pharmaceutical compositions containing such analogues and methods for using these analogues in the treatment of HCV infection.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Hepatitis C virus (HCV) is the major etiological agent of post-transfusion and community-acquired non-A non-B hepatitis worldwide. It is estimated that over 100 million people worldwide are infected by the virus. A high percentage of carriers become chronically infected and many progress to chronic liver disease, so-called chronic hepatitis C. This group is in turn at high risk for serious liver disease such as liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and terminal liver disease leading to death.

The mechanism by which HCV establishes viral persistence and causes a high rate of chronic liver disease has not been thoroughly elucidated. It is not known how HCV interacts with and evades the host immune system. In addition, the roles of cellular and humoral immune responses in protection against HCV infection and disease have yet to be established.

Immunoglobulins have been reported for prophylaxis of transfusion-associated viral hepatitis, however, the Center for Disease Control does not presently recommend immunoglobulins treatment for this purpose. The lack of an effective protective immune response is hampering the development of a vaccine or adequate post-exposure prophylaxis measures, so in the near-term, hopes are firmly pinned on antiviral interventions.

Various clinical studies have been conducted with the goal of identifying pharmaceutical agents capable of effectively treating HCV infection in patients afflicted with chronic hepatitis C. These studies have involved the use of interferon-alpha, alone and in combination with other antiviral agents. Such studies have shown that a substantial number of the participants do not respond to these therapies, and of those that do respond favorably, a large proportion were found to relapse after termination of treatment.

Until recently, interferon (IFN) was the only available therapy of proven benefit approved in the clinic for patients with chronic hepatitis C. However the sustained response rate is low, and interferon treatment also induces severe side-effects (i.e. retinopathy, thyroiditis, acute pancreatitis, depression) that diminish the quality of life of treated patients. Recently, interferon in combination with ribavirin has been approved for patients non-responsive to IFN alone. However, the side effects caused by IFN are not alleviated with this combination therapy.

Therefore, a need exists for the development of effective antiviral agents for treatment of HCV infection that overcomes the limitations of existing pharmaceutical therapies.

HCV is an enveloped positive strand RNA virus in the Flaviviridae family. The single strand HCV RNA genome is approximately 9500 nucleotides in length and has a single open reading frame (ORF) encoding a single large polyprotein of about 3000 amino acids. In infected cells, this polyprotein is cleaved at multiple sites by cellular and viral proteases to produce the structural and non-structural (NS) proteins. In the case of HCV, the generation of mature nonstructural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) is effected by two viral proteases. The first one, as yet poorly

characterized, cleaves at the NS2-NS3 junction; the second one is a serine protease contained within the N-terminal region of NS3 (henceforth referred to as NS3 protease) and mediates all the subsequent cleavages downstream of NS3, both in *cis*, at the NS3-NS4A cleavage site, and in *trans*, for the remaining NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B sites. The NS4A protein appears to serve multiple functions, acting as a cofactor for the NS3 protease and possibly assisting in the membrane localization of NS3 and other viral replicase components. The complex formation of the NS3 protein with NS4A seems necessary to the processing events, enhancing the proteolytic efficiency at all of the sites. The NS3 protein also exhibits nucleoside triphosphatase and RNA helicase activities. NS5B is a RNA-dependent RNA polymerase that is involved in the replication of HCV.

Patent application WO 97/06804 describes the (-) enantiomer of the nucleoside analogue cytosine-1,3-oxathiolane (also known as 3TC) as active against HCV. This compound, although reported as safe in previous clinical trials against HIV and HBV, has yet to be clinically proven active against HCV and its mechanism of action against the virus has yet to be reported.

A general strategy for the development of antiviral agents is to inactivate virally encoded enzymes that are essential for the replication of the virus

In this vein, intense efforts to discover compounds which inhibit the NS3 protease or RNA helicase of HCV have led to the following disclosures:

- US patent 5,633,388 describes heterocyclic-substituted carboxamides and analogues as being active against HCV. These compounds are directed against the helicase activity of the NS3 protein of the virus but clinical tests have not yet been reported.
- A phenanthrenequinone has been reported by Chu et al., (Tet. Lett., (1996), 7229-7232) to have activity against the HCV NS3 protease *in vitro*.

No further development on this compound has been reported.

- A paper presented at the Ninth International Conference on Antiviral Research, Urabandai, Fukyshima, Japan (1996) (Antiviral Research, (1996), 30, 1, A23 (abstract 19)) reports thiazolidine derivatives to be inhibitory to the HCV protease.

Several studies have reported compounds inhibitory to other serine proteases, such as human leukocyte elastase. One family of these compounds is reported in WO 95/33764 (Hoechst Marion Roussel, 1995). The peptides disclosed in that application are morpholinylcarbonyl-benzoyl-peptide analogues that are structurally different from the peptides of the present invention.

- WO 98/17679 from Vertex Pharmaceuticals Inc. discloses inhibitors of serine protease, particularly, Hepatitis C virus NS3 protease
- Hoffman LaRoche has also reported hexapeptides that are proteinase inhibitors useful as antiviral agents for the treatment of HCV infection.
- Steinkühler *et al.* and Ingallinella *et al.* have published on NS4A-4B product inhibition (Biochemistry (1998), 37, 8899-8905 and 8906-8914).

None of the prior patent applications described above disclose suggest cyclic peptides active against the Hepatitis C virus and selective for that protease against other serine proteases.

WO 99/07733 and WO 99/07734 disclose hexa to tetra-peptides and analogs that inhibit the NS3 protease. However, these disclosures do not suggest or lead to the design of macrocyclic analogs of the present invention.

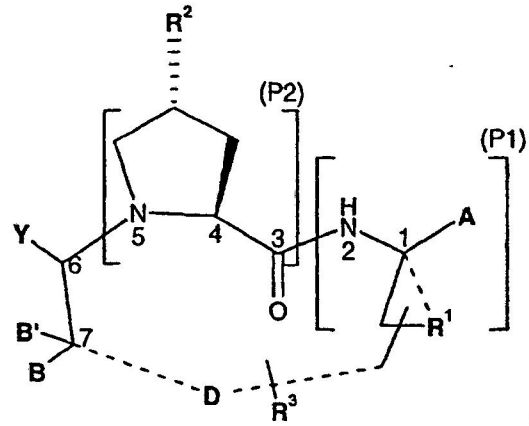
One advantage of the present invention is that it provides macrocyclic dipeptides that are inhibitory to the NS3 protease of the hepatitis C virus.

A further advantage of one aspect of the present invention resides in the fact that these peptides specifically inhibit the NS3 protease and do not show significant inhibitory activity at concentrations up to 300 μM against other serine proteases such as human leukocyte elastase (HLE), porcine pancreatic elastase (PPE), or bovine pancreatic chymotrypsin, or cysteine proteases such as human liver cathepsin B (Cat B).

A further advantage of the present invention is that it provides small peptides of low molecular weight that are capable of penetrating cell membranes and are active in cell culture and *in vivo* with good pharmacokinetic profile.

SUMMARY OF THE INVENTION

Included in the scope of the invention are compounds of formula (I):



(I)

wherein:

R^1 is H, CHO, CH_2OH, thiol; or a C_{1-3} alkylene optionally linked to the carbon atom number 1 to form a "spiro"-cyclic system; and

R^2 is R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} or $NR^{2A}R^{2B}$ wherein R^{2A} and R^{2B} are independently:

C_{1-16} alkyl, C_{2-16} alkenyl, saturated or unsaturated C_{3-16} cycloalkyl, said alkyl, alkenyl or cycloalkyl being optionally substituted with NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalkyl, or carboxyl; said alkyl, alkenyl or cycloalkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N; or

R^{2A} and R^{2B} are independently selected from a first C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl, said first aryl or aralkyl optionally substituted with C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalkyl, C_{1-6} alkoxy, carboxyl, lower(alkyl) carboxylic acid, or a second aryl or aralkyl; said first and second aryl or aralkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N;

said saturated or unsaturated cycloalkyl, aryl or aralkyl being optionally fused with a second 5-, 6-, or 7-membered ring to form a cyclic system or heterocycle, said second ring being optionally substituted with NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalkyl, carboxyl or lower(alkyl) carboxylic acid; said second ring optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N;

Y is H, carbonyl, thiocarbonyl, C_{1-6} alkyl, C_{3-10} cycloalkyl, C_{1-6} alkoxy, $C_{6 \text{ or } 10}$ aryl or C_{7-16} aralkyl;

B is H, hydroxyl, amino, amide, carbonyl, thiol, alkyl, aryl, or B is a heteroatom- containing saturated or unsaturated alkyl chain linked to D to form a heterocycle;

B' is H, OH, NH_2, SH, or a substituted amino.

D is a C_{5-10} saturated or unsaturated alkylene chain optionally containing one

to three heteroatoms independently selected from: O, S or N;

R^3 is H or from one to five substituents independently selected from hydroxyl, halo, amino, amide, carbonyl, thiol, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl ;

and

A is a carboxylic acid or a N-substituted amide;

or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.

Included within the scope of this invention is a pharmaceutical composition comprising an anti-hepatitis C virally effective amount of a compound of formula **I**, or a therapeutically acceptable salt or ester thereof, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier medium or auxiliary agent.

An important aspect of the invention involves a method of treating a hepatitis C viral infection in a mammal by administering to the mammal an anti-hepatitis C virally effective amount of the compound of formula **I**, or a therapeutically acceptable salt or ester thereof or a composition as described above.

Another important aspect involves a method of inhibiting the replication of hepatitis C virus by exposing the virus to a hepatitis C viral NS3 protease inhibiting amount of the compound of formula **I**, or a therapeutically acceptable salt or ester thereof or a composition as described above.

Still another aspect involves a method of treating a hepatitis C viral infection in a mammal by administering thereto an anti-hepatitis C virally effective amount of a combination of the compound of formula **I**, or a therapeutically acceptable salt or ester thereof. According to one embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention comprise an additional

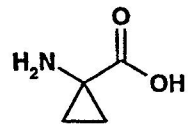
immunomodulatory agent. Examples of additional immunomodulatory agents include but are not limited to, α-, β-, and δ-interferons.

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

Definitions

As used herein, the following definitions apply unless otherwise noted: With reference to the instances where *(R)* or *(S)* is used to designate the absolute configuration of a substituent, e.g. R^1 of the compound of formula I, the designation is done in the context of the compound and not in the context of the substituent alone.

As used herein the term "1-aminocyclopropyl-carboxylic acid" (ACCA) refers to a compound of formula:

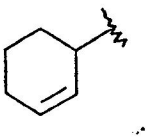


The term "halo" as used herein means a halogen substituent selected from bromo, chloro, fluoro or iodo.

The term "C_{1-6} alkyl" or "(lower)alkyl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means acyclic, straight or branched chain alkyl substituents containing from 1 to six carbon atoms and includes, for example, methyl, ethyl, propyl, butyl, hexyl, 1-methylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 1,1-dimethylethyl.

The term "C_{3-10} cycloalkyl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means a cycloalkyl substituent containing from three to seven carbon atoms and includes cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl and cycloheptyl.

The term "unsaturated cycloalkyl" includes, for example, the substituent cyclohexenyl:



The term "C_{6-10} alkenyl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means an alkyl substituent as defined above containing from 6 to 10 carbon atoms, and further containing at least one double bond.

The term "saturated or unsaturated alkylene" as used herein means a divalent alkyl substituent derived by the removal of one hydrogen atom from each end of a saturated or unsaturated straight or branched chain aliphatic hydrocarbon and includes, for example, $-CH_2CH_2C(CH_3)_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH=CHCH_2CH_2-$ or $-CH_2C\equiv CCH_2CH_2-$.

The term "C_{1-6} alkoxy" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means the substituent $-O-C_{1-6}$ alkyl wherein alkyl is as defined above containing up to six carbon atoms. Alkoxy includes methoxy, ethoxy, propoxy, 1-methylethoxy, butoxy and 1,1-dimethylethoxy. The latter substituent is known commonly as *tert*-butoxy.

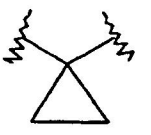
The term "C_6 or C_{10} aryl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means either an aromatic monocyclic system containing 6 carbon atoms or an aromatic bicyclic system containing 10 carbon atoms. For example, aryl includes a phenyl or a napthyl – ring system.

The term "C_{7-16} aralkyl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means an aryl as defined above linked through an alkyl

group, wherein alkyl is as defined above containing from 1 to 6 carbon atoms. Aralkyl includes for example benzyl, and butylphenyl.

The term "(lower)alkyl carboxylic acid" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means a carboxylic acid group (COOH) linked through a (lower)alkyl group as defined above and includes for example butyric acid.

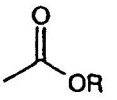
The term "spiro"-cyclic group represents for example spiro-cyclopropyl, also represented as:



The term "heterocycle" or "heterocyclic ring" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means a monovalent substituent derived by removal of a hydrogen from a five-, six-, or seven-membered saturated or unsaturated heterocycle containing from one to four heteroatoms selected from nitrogen, oxygen and sulfur. Examples of suitable heterocycles include: pyrrolidine, tetrahydrofuran, thiazolidine, pyrrole, thiophene, diazepine, 1H-imidazole, 1-methyl-1H-imidazole, isoxazole, thiazole, 2-methylthiazole, 2-aminothiazole, piperidine, 1,4-dioxane, 4-morpholine, pyridine, 2-methylpyridine, pyrimidine, 4-methylpyrimidine and 2,4-dimethylpyrimidine. This term also includes a heterocycle as defined above fused to one or more other cycle be it a heterocycle or any other cycle. Examples of suitable heterocyclic systems include: thiazolo[4,5-b]-pyridine, quinoline, or indole.

The term "pharmaceutically acceptable ester" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means esters of the compound of

formula I in which any of the carboxyl functions of the molecule, but preferably the carboxy terminus, is replaced by an alkoxycarbonyl function:



in which the **R** moiety of the ester is selected from alkyl (e.g. methyl, ethyl, *n*-propyl, t-butyl, *n*-butyl); alkoxyalkyl (e.g. methoxymethyl); alkoxyacyl (e.g. acetoxymethyl); aralkyl (e.g. benzyl); aryloxyalkyl (e.g. phenoxymethyl); aryl (e.g. phenyl), optionally substituted with halogen, C_{1-4} alkyl or C_{1-4} alkoxy. Other suitable prodrug esters can be found in Design of prodrugs, Bundgaard, H. Ed. Elsevier (1985) incorporated herewith by reference. Such pharmaceutically acceptable esters are usually hydrolyzed *in vivo* when injected in a mammal and transformed into the acid form of the compound of formula **I**.

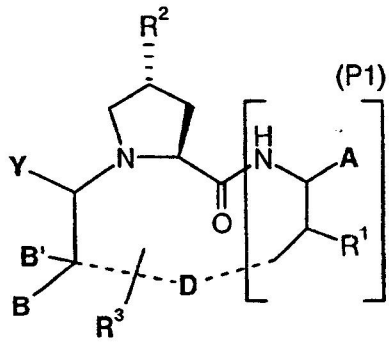
With regard to the esters described above, unless otherwise specified, any alkyl moiety present advantageously contains 1 to 16 carbon atoms, particularly 1 to 6 carbon atoms. Any aryl moiety present in such esters advantageously comprises a phenyl group.

In particular the esters may be a C_{1-16} alkyl ester, an unsubstituted benzyl ester or a benzyl ester substituted with at least one halogen, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, nitro or trifluoromethyl.

The term "pharmaceutically acceptable salt" as used herein includes those derived from pharmaceutically acceptable bases. Examples of suitable bases include choline, ethanolamine and ethylenediamine. Na^+, K^+, and Ca^{++} salts are also contemplated to be within the scope of the invention (also see Pharmaceutical salts, Birge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19, incorporated herein by reference).

Preferred embodiments

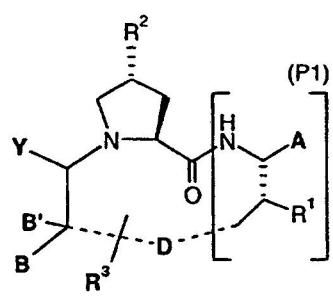
Compounds of formula I can preferably be represented by formula **Ia:**



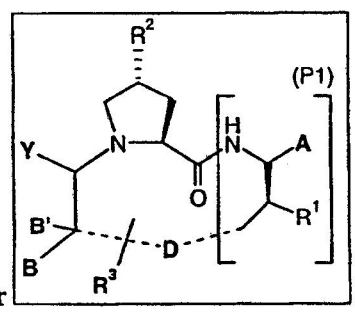
Formula **Ia**

wherein R^1 is preferably H, CHO, CH_2OH or CH_2SH, OH or SH. More preferably, R^1 is H, or CHO. Most preferably R^1 is H.

More preferably, compounds of formula **Ia** are present as a single enantiomers represented by formulas **IIa** or **IIb:**



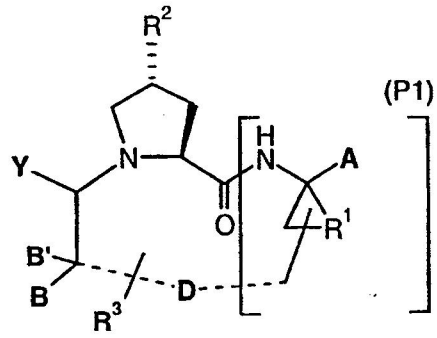
(IIa); or



(IIb).

Most preferably, compounds of formula Ia are present as a single enantiomer of formula **IIb.**

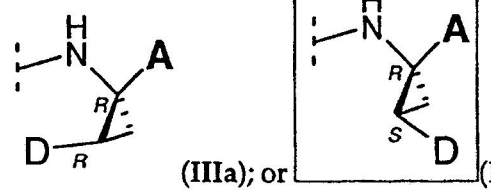
Alternatively, R^1 is preferably a C_{1-3} alkylene linked to the carbon atom number 1 to form a "spiro"-cyclic system such that compounds of formula **I** can be represented by formula **Ib:**



Formula **Ib**.

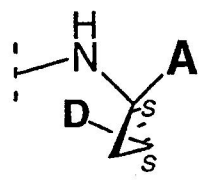
More preferably, R^1 is a C_1 or C_2 alkylene chain that forms a spirocyclopropyl or spirocyclobutyl substituent. Most preferably, R^1 is $-CH_2-$ and forms a spirocyclopropyl.

When compounds of formula **Ib** are preferred, they can exist in 4 different diastereoisomers represented by conformations **IIIa, IIIb, IIIc** or **IIId**.

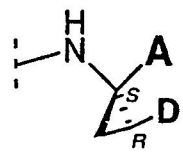


(IIIa); or

(IIIb); or



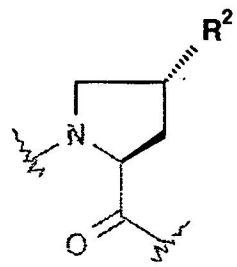
(IIIc) ; or



(IIId).

Compounds of formula **Ib** are more preferred when **D** is linked to the *R* carbon atom of the cyclopropyl ring as represented by formulas **IIIa** (1*R*, 2*R*) and **IIIb** (1*R*, 2*S*). Most preferably, **D** is preferably linked *syn* to the carboxylic acid **A** (*S*, *R*) as represented by formula **IIIb**.

Preferably R^2 is a substituent at the 3-, 4-, or 5-position of the proline ring. More preferably R^2 is substituted at the 4- or 5-position. Most preferably, R^2 is substituted at the 4-position of proline with the stereochemistry shown below:



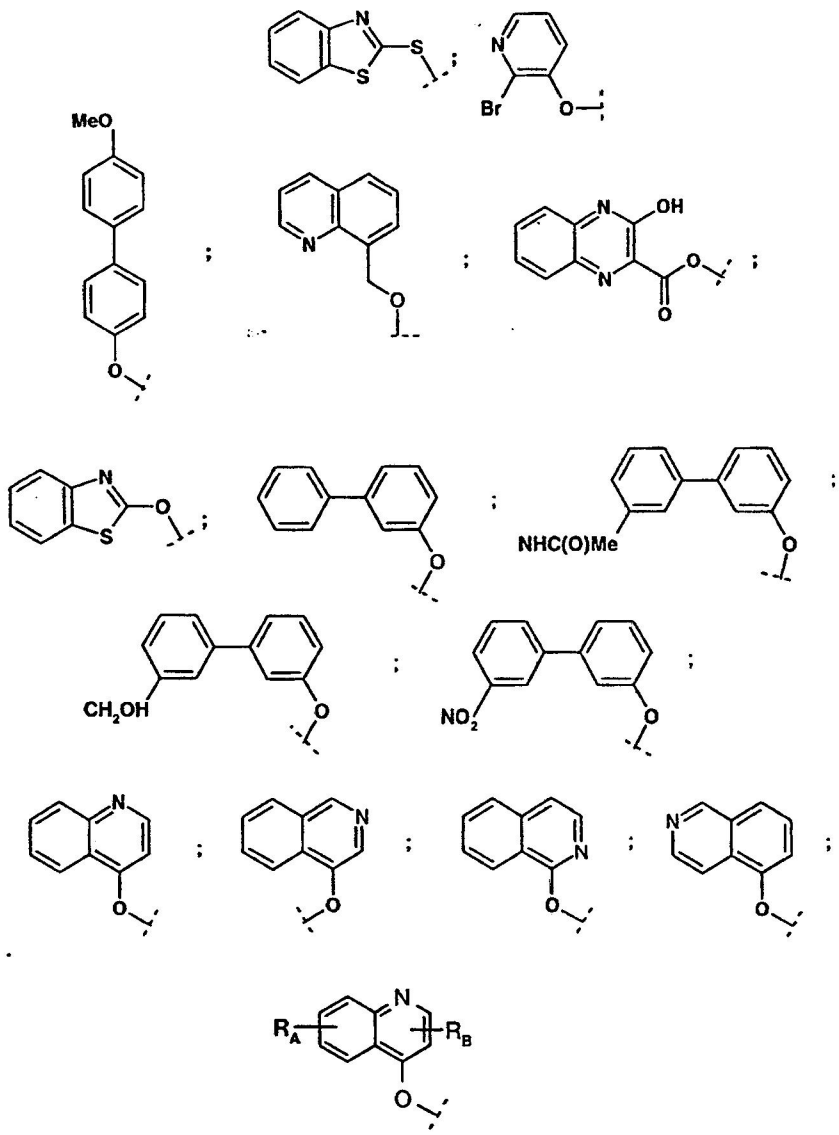
wherein R^2 is preferably R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} or $NR^{2A}R^{2B}$ wherein R^{2A} and R^{2B} are independently:

C_{1-16} alkyl, C_{2-16} alkenyl, saturated or unsaturated C_{3-16} cycloalkyl, said alkyl, alkenyl or cycloalkyl being optionally substituted with NH_2, OH, halo, haloalkyl, or carboxyl; said alkyl, alkenyl or cycloalkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O and N; or

R^{2A} and R^{2B} are independently selected from a first C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl, said first aryl or aralkyl optionally substituted with C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, halo, haloalkyl, C_{1-6} alkoxy, carboxyl, lower(alkyl) carboxylic acid, or a phenyl; said first aryl or aralkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O and N;

said saturated or unsaturated cycloalkyl, aryl or aralkyl being optionally fused with a second 5-, 6-, or 7-membered ring to form a cyclic system or heterocycle, said 5-, 6-, or 7-membered ring being optionally substituted with NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, halo, haloalkyl; said 5-, 6- or 7- membered ring optionally containing at least one heteroatom independently selected from the group consisting of: O and N.

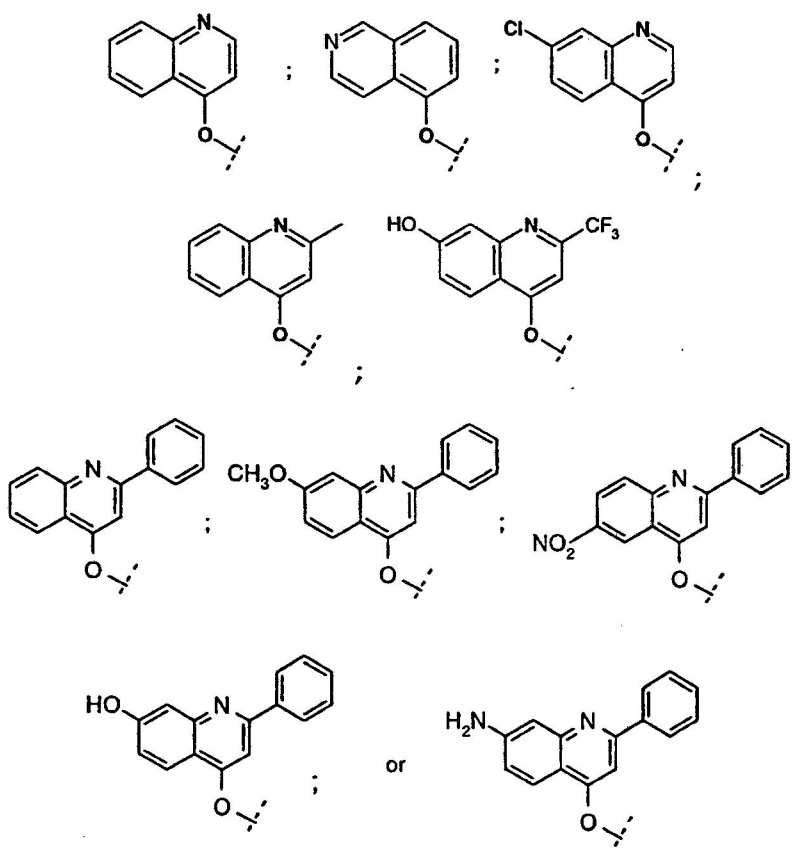
More preferably, R^2 is Bn; $PhCH_2CH_2$; $PhCH_2CH_2CH_2$; O-Bn; o-tolylmethoxy; m-tolylmethoxy; p-tolylmethoxy; 1-naphthyloxy; 2-naphthyloxy; 1-naphthylmethoxy; 2-naphthylmethoxy; (4-tert-butyl)methoxy; $(3I\text{-}Ph)CH_2O$; (4Br-Ph)O; (2Br-Ph)O; (3Br-Ph)O; (4I-Ph)O; $(3Br\text{-}Ph)CH_2O$; $(3,5\text{-}Br_2\text{-}Ph)CH_2O$;



wherein R_A is OH, alkyl, alkoxy, halo, haloalkyl, nitro, amino or amide; and R_B is alkyl, haloalkyl or aryl.

Most preferably, R^2 is OR^{2A} wherein R^{2A} is a C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl optionally substituted with C_{1-6} alkyl, NH_2, $NHC(O)CH_3$; NO_2, OH, halo, carboxyl or lower(alkyl) carboxylic acid or a phenyl.; said aryl or aralkyl optionally containing at least one heteroatom independently selected from the group consisting of: O and N.

Still most preferably, R^2 is:



Preferably, Y is carbonyl, thiocarbonyl, alkoxy, aryl or aralkyl. More preferably, Y is carbonyl, alkoxy, aryl or aralkyl. Most preferably, Y is carbonyl.

Preferably, **B** is H, amino, amido, carboxy, carbamate, urea, or an aryl, or **B** is a nitrogen-containing saturated or unsaturated alkyl chain linked to **D** to form a heterocycle optionally substituted with R^4 wherein R^4 is an alkyl, alkenyl, alkoxy, or aryl, all optionally containing a heteroatom; said heterocycle also optionally fused with a cycloalkyl or aryl to form a bicyclic system. For example, **B** may be a pyrrole or indole ring.

More preferably, **B** is H, amino, an amide of the formula N-C(O)R^5, an acyl of the formula –C(O)-R^5, a carbamate of the formula N-C(O)-OR^5, a urea of the formula N-C(O)-N-R^5, or an aryl optionally substituted with R^5, wherein R^5 is lower alkyl, aryl or a saturated or unsaturated heterocycle.

Most preferably, **B** is *tert*-butoxycarbonyl or acetyl.

Preferably, **B'** is H, OH, NH_2, SH, or a substituted amino. More preferably, **B'** is OH, NH_2, SH, or substituted amino. Most preferably, **B'** is OH when **B** is an aryl.

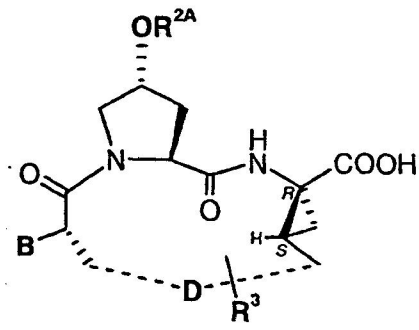
Preferably, **D** is a C_6 to C_9 alkylene, alkenylene or alkynylene chain optionally containing one or two heteroatom selected from: O, S or N, said chain optionally mono- to penta-substituted with R^3. More preferably, **D** is a C_6 to C_8 alkylene or alkenylene chain optionally containing one or two heteroatom selected from: O or S, said chain optionally mono- to tri-substituted with R^3. Most preferably, **D** is a C_7 or C_8 alkylene or alkenylene chain optionally containing one or two heteroatom selected from: O or S, said chain optionally mono- or di-substituted with R^3.

Preferably, R^3 is hydroxy, thio, amino, halo, carbonyl, alkyl, alkoxy or aryl. More preferably, R^3 is hydroxy, thio, amino, halo or carbonyl. Most preferably, R^3 is hydroxy, thio, halo or carbonyl.

Preferably, A is a carboxylic acid or $C(O)N(R^{6A})R^{6B}$ wherein R^{6A} and R^{6B} are independently H or C_{1-6} alkyl optionally substituted with hydroxy, thio, amino, halo, alkoxy, aryl, aralkyl, cycloalkyl or a heterocycle.

More preferably, A is C(O)OH, C(O)NH-aryl or C(O)NH-aralkyl. Most preferably, A is C(O)OH, C(O)NH-benzyl or $C(O)NH-CH(CH_3)$-phenyl.

Even most preferably, compounds of the invention are represented by formula III:



Formula III

wherein:

R^{2A} is selected from a first C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl, said first aryl or aralkyl optionally substituted with C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalkyl, C_{1-6} alkoxy, carboxyl, lower(alkyl) carboxylic acid, or a second aryl or aralkyl; said first and second aryl or aralkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N; said saturated or unsaturated cycloalkyl, aryl or aralkyl being optionally fused with a second 5-, 6-, or 7-membered ring to form a cyclic system or heterocycle, said second ring being optionally substituted with NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalkyl, carboxyl or lower(alkyl) carboxylic acid; said second ring optionally

containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N;

B is H, or a carbamate of the formula N-C(O)-OR^5 wherein R^5 is lower alkyl;

D is a C_{5-10} alkylene, alkenylene or alkynylene chain optionally containing one to three heteroatoms independently selected from: O, S or N;

R^3 is one, two or three substituents independently selected from hydroxyl, halo, amino, amide, carbonyl, thiol, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl;

or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.

Finally, included within the scope of this invention are all compounds of formula **I** as presented in Tables 1 to 4.

According to an alternate embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention may additionally comprise an antiviral agent. Examples of antiviral agents include, ribavirin and amantadine.

According to another alternate embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention may additionally comprise other inhibitors of HCV protease.

According to yet another alternate embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention may additionally comprise an inhibitor of other targets in the HCV life cycle, such as helicase, polymerase, or metalloprotease.

The pharmaceutical compositions of this invention may be administered orally, parenterally or via an implanted reservoir. We prefer oral administration or administration by injection. The pharmaceutical compositions of this invention may contain any conventional non-toxic pharmaceutically-acceptable carriers, adjuvants or vehicles. In some cases, the pH of the formulation may be adjusted with pharmaceutically acceptable acids, bases or buffers to enhance the stability of the formulated compound or its delivery form. The term parenteral as used herein includes subcutaneous, intracutaneous, intravenous, intramuscular, intra-articular, intrasynovial, intrasternal, intrathecal, and intralesional injection or infusion techniques.

The pharmaceutical compositions may be in the form of a sterile injectable preparation, for example, as a sterile injectable aqueous or oleaginous suspension. This suspension may be formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents (such as, for example. Tween 80) and suspending agents.

The pharmaceutical compositions of this invention may be orally administered in any orally acceptable dosage form including, but not limited to, capsules, tablets, and aqueous suspensions and solutions. In the case of tablets for oral use, carriers which are commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form, useful diluents include lactose and dried corn starch. When aqueous suspensions are administered orally, the active ingredient is combined with emulsifying and suspending agents. If desired, certain sweetening and/or flavoring and/or coloring agents may be added.

Other suitable vehicles or carriers for the above noted formulations and

compositions can be found in standard pharmaceutical texts, e.g. in "Remington's Pharmaceutical Sciences", 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1995.

Dosage levels of between about 0.01 and about 100 mg/kg body weight per day, preferably between about 0.5 and about 75 mg/kg body weight per day of the protease inhibitor compounds described herein are useful in a monotherapy for the prevention and treatment of HCV mediated disease. Typically, the pharmaceutical compositions of this invention will be administered from about 1 to about 5 times per day or alternatively, as a continuous infusion. Such administration can be used as a chronic or acute therapy. The amount of active ingredient that may be combined with the carrier materials to produce a single dosage form will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration. A typical preparation will contain from about 5% to about 95% active compound (*w/w*). Preferably, such preparations contain from about 20% to about 80% active compound.

As the skilled artisan will appreciate, lower or higher doses than those recited above may be required. Specific dosage and treatment regimens for any particular patient will depend upon a variety of factors, including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health status, sex, diet, time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity and course of the infection, the patient's disposition to the infection and the judgment of the treating physician. Generally, treatment is initiated with small dosages substantially less than the optimum dose of the peptide. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. In general, the compound is most desirably administered at a concentration level that will generally afford antivirally effective results

without causing any harmful or deleterious side effects.

When the compositions of this invention comprise a combination of a compound of formula I and one or more additional therapeutic or prophylactic agent, both the compound and the additional agent should be present at dosage levels of between about 10 to 100%, and more preferably between about 10 and 80% of the dosage normally administered in a monotherapy regimen.

When these compounds or their pharmaceutically acceptable salts are formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier, the resulting composition may be administered *in vivo* to mammals, such as man, to inhibit HCV NS3 protease or to treat or prevent HCV virus infection. Such treatment may also be achieved using the compounds of this invention in combination with agents which include, but are not limited to: immunomodulatory agents, such as α-, β-, or γ-interferons; other antiviral agents such as ribavirin, amantadine; other inhibitors of HCV NS3 protease; inhibitors of other targets in the HCV life cycle such as helicase, polymerase, metalloprotease, or internal ribosome entry site (IRES); or combinations thereof. The additional agents may be combined with the compounds of this invention to create a single dosage form. Alternatively these additional agents may be separately administered to a mammal as part of a multiple dosage form.

Accordingly, another embodiment of this invention provides methods of inhibiting HVC NS3 protease activity in mammals by administering a compound of the formula I, wherein the substituents are as defined above.

In a preferred embodiment, these methods are useful in decreasing HCV NS3 protease activity in a mammal. If the pharmaceutical composition comprises

only a compound of this invention as the active component, such methods may additionally comprise the step of administering to said mammal an agent selected from an immunomodulatory agent, an antiviral agent, a HCV protease inhibitor, or an inhibitor of other targets in the HCV life cycle such as helicase, polymerase, or metalloprotease. Such additional agent may be administered to the mammal prior to, concurrently with, or following the administration of the compositions of this invention.

In an alternate preferred embodiment, these methods are useful for inhibiting viral replication in a mammal. Such methods are useful in treating or preventing HCV disease. If the pharmaceutical composition comprises only a compound of this invention as the active component, such methods may additionally comprise the step of administering to said mammal an agent selected from an immunomodulatory agent, an antiviral agent, a HCV protease inhibitor, or an inhibitor of other targets in the HCV life cycle. Such additional agent may be administered to the mammal prior to, concurrently with, or following the administration of the composition according to this invention.

The compounds set forth herein may also be used as laboratory reagents. The compounds of this invention may also be used to treat or prevent viral contamination of materials and therefore reduce the risk of viral infection of laboratory or medical personnel or patients who come in contact with such materials (e.g. blood, tissue, surgical instruments and garments, laboratory instruments and garments, and blood collection or transfusion apparatuses and materials).

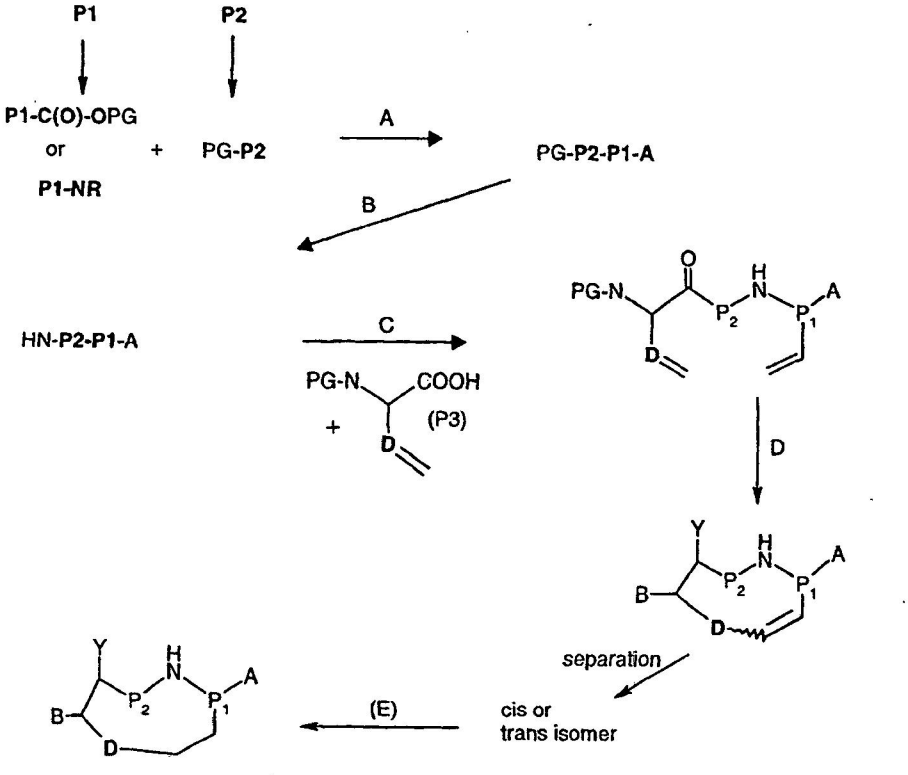
Methodology

PROCESS

The compounds of the present invention (wherein **Y** is not H, and **B** is not H) were synthesized according to a general process as illustrated in Scheme I (wherein PG are specific carboxy protecting groups as will be recognized by persons skilled in the art).

When the invention covers compounds of formula I wherein **A** is a N-substituted amide, P1 is coupled to an appropriate amine prior to the coupling to P2. Such amination will be readily recognized by persons skilled in the art. As will be recognized by persons skilled in the art, such amine is not protected but bears any relevant substituent (R).

Scheme I



A, B, C) Briefly, the P1, P2, and P3 can be linked by well known peptide coupling techniques. Generally, peptides are elongated by deprotecting the α-amino group of the N-terminal residue and coupling the unprotected carboxyl group of the next suitably N-protected amino acid through a peptide linkage using the methods described or by solid phase peptide synthesis according to the method originally described in Merrifield, J. Am. Chem. Soc., (1963), 85, 2149-2154, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

The functional groups of the constituent amino acids generally must be protected during the coupling reactions to avoid formation of undesirable side products. Most of the protecting groups that can be used are listed in Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, New York (1981) and "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 3, Academic Press, New York (1981), the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

D) Ring-closing metathesis was carried out using catalytic amounts of bis-(tricyclohexylphosphine)benzylidene ruthenium IV dichloride as described in the literature: Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, *118*, 9606-9614.

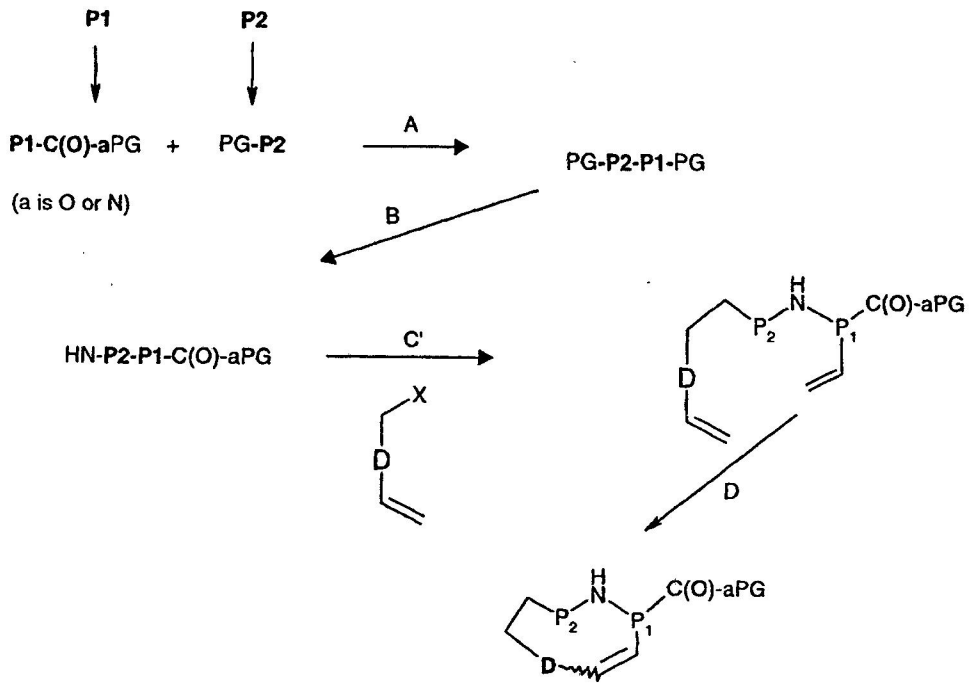
In most cases, the macrocyclic analogs having a *cis* double bond were predominately formed. However, in cases where a mixture of the *cis* and *trans* product were obtained, the two compounds could be separated by preparative C18 reversed phase HPLC.

E) Optionally, the double bond may be reduced by standard hydrogenation methods well know in the art.

Once the elongation of the peptide is completed all of the protecting groups are removed, the protecting groups are removed in whatever manner is dictated by the choice of protecting groups. These procedures are well known to those skilled in the art.

Compounds of formula I wherein **Y** is H and **B** is H are synthesized in the following manner:

Scheme Ia



wherein X is Br or I.

C') The addition of **D** is carried out by direct alkylation of the nitrogen of the P2 proline with the alkyl halide **D**.

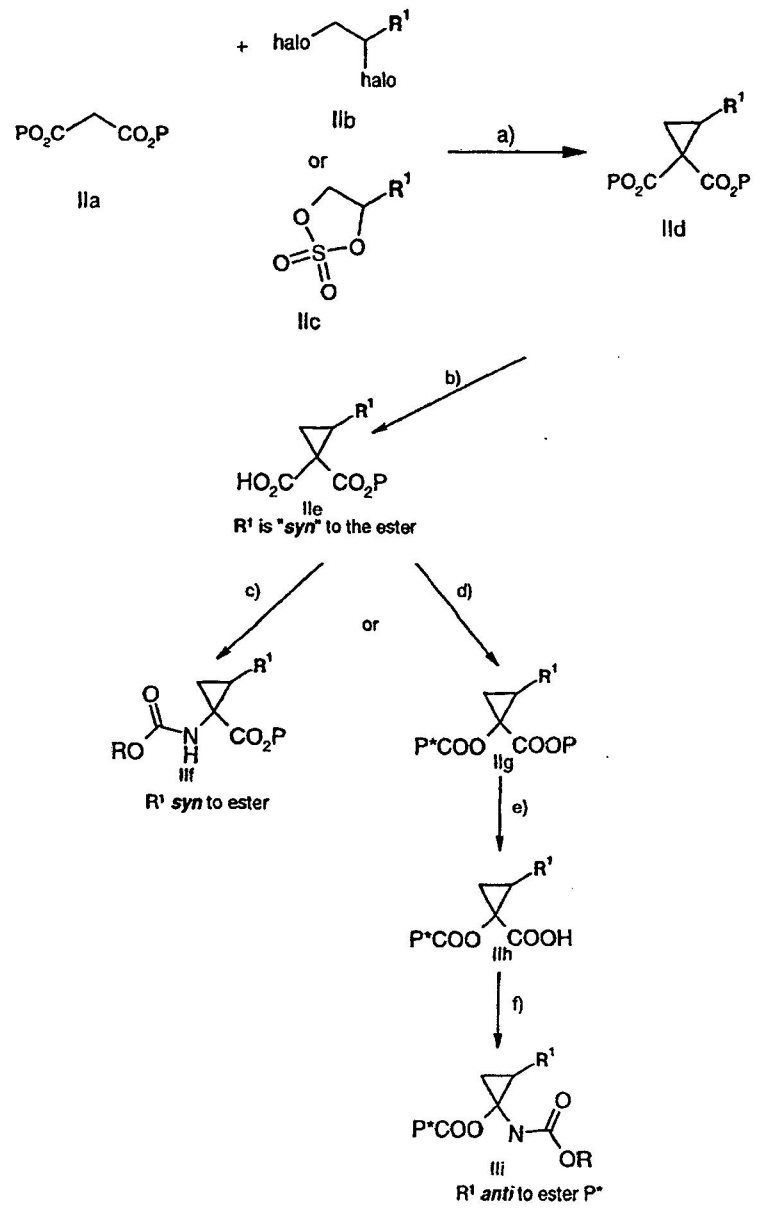
Cyclization and hydrogenation is carried out as previously described.

Synthesis of P1 moieties.

1. Synthesis of the 4 possible isomers of P1 moieties (2-substituted 1-aminocyclopropyl carboxylic acid)

The synthesis was done according to Scheme II.

Scheme II



a) Briefly, di-protected malonate **IIa** and 1,2-dihaloalkane **IIb** or cyclic sulfate **IIc** (synthesized according to K. Burgess and Chun-Yen KE (Synthesis, (1996), 1463-1467) are reacted under basic conditions to give the diester **IId**.

b) A regioselective hydrolysis of the less hindered ester is performed to give the acid **IIe**.

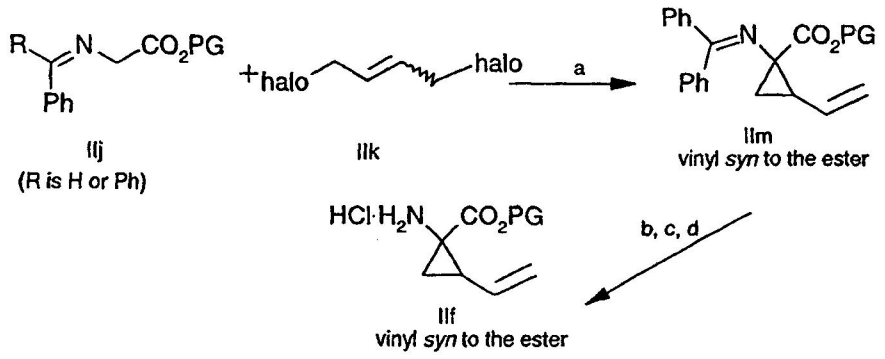
c) This acid **IIe** is subjected to a Curtius rearrangement to give a racemic mixture of 1-aminocyclopropylcarboxylic acid derivatives **IIf** with R^1 being *syn* to the carboxyl group.

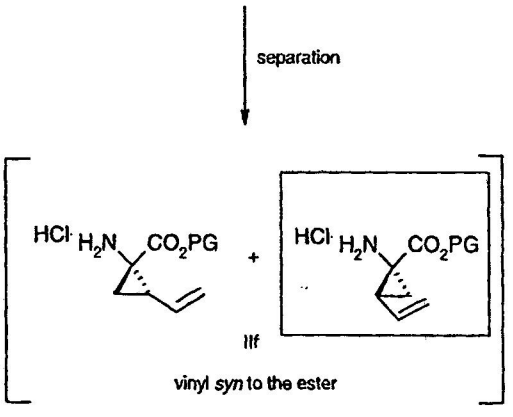
d, e) Alternatively, selective ester formation from the acid **IIe** with an appropriate halide (P*Cl) or alcohol (P*OH) forms diester **IIg** in which the P* ester is compatible with the selective hydrolysis of the P ester. Hydrolysis of P ester provides acid **IIh**.

f) A Curtius rearrangement on **IIh** gives a racemic mixture of 1-aminocyclopropylcarboxylic acid derivatives **IIi** with R^1 group being *anti* to the carboxyl group. A specific embodiment for this synthesis is presented in Example 3.

2. An alternative synthesis for the preparation of derivatives **IIf** (when R^1 is vinyl and *syn* to the carboxyl group) is described below.

Scheme IIa





Treatment of commercially available imine **IIj** with 1,4-dihalobutene **IIk** in presence of a base produces, after hydrolysis of the resulting imine **IIm, IIf** having the allyl substituent *syn* to the carboxyl group. This process is presented in Example 1.

Resolution of all of the above enantiomeric mixtures can be carried out via enzymatic separation with Alcalase® as described in Example 2. Other means of resolution and determination of the absolute stereochemistry are described in co-pending applications 60/095,931 and 09/219,939 herein incorporated by reference in their entirety.

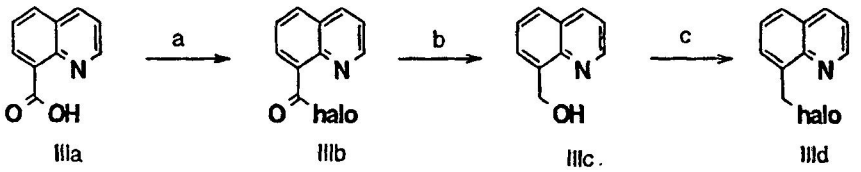
Synthesis of P2 moieties.

1. Synthesis of precursors:

A) Synthesis of haloarylmethane derivatives.

The preparation of halomethyl-8-quinoline **IIId** was done according to the procedure of K.N. Campbell et al., J. Amer. Chem. Soc., (1946), 68, 1844.

Scheme III

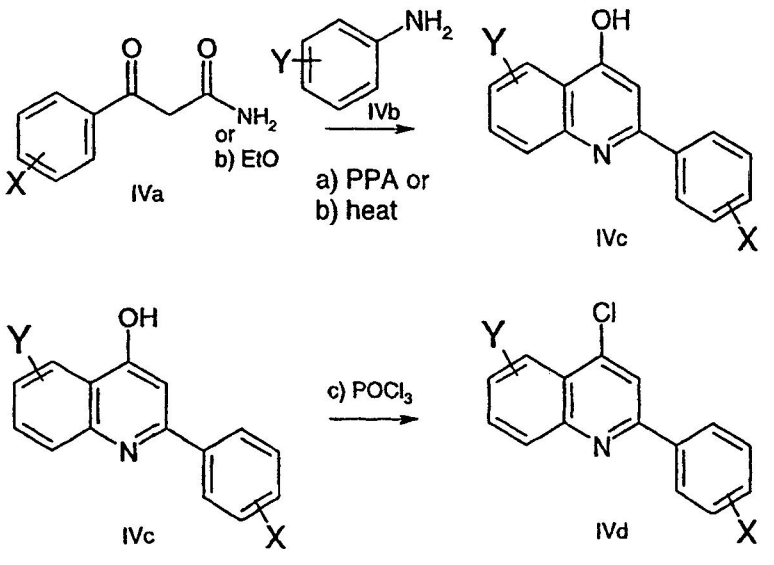


Briefly, 8-quinoline carboxylic acid **IIIa** was converted to the corresponding alcohol **IIIc** by reduction of the corresponding acyl halide **IIIb** with a reducing agent such as lithium aluminium hydride. Treatment of alcohol **IIIb** with the appropriate hydrohaloacid gives the desired halo derivative **IIId.**

B) Synthesis of aryl alcohols derivatives:

2-phenyl-4-hydroxyquinoline derivatives **IVc** were prepared according to G.A.M. Giardina *et al.* (J. Med. Chem., (1997), 40, 1794-1807).

Scheme IV



X & Y = aryl, aralkyl, alkoxy, OH, SH, halo, NH_2, NO_2, etc..

a) Benzoylacetamide (**IVa**) was condensed with the appropriate aniline (**IVb**) and the enamine obtained was cyclized with polyphosphoric acid to give the corresponding 2-phenyl-4-hydroxyquinoline (**IVc**).

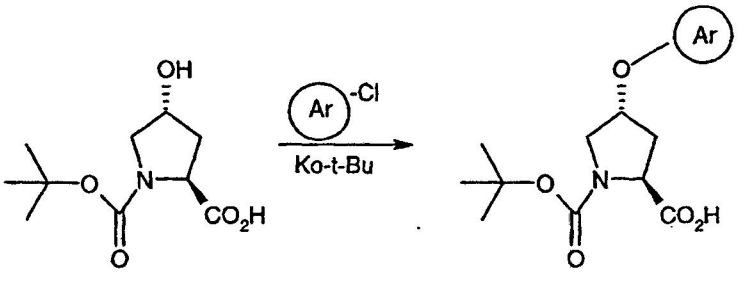
Or alternatively, the process can be carried out in a different manner:

b) Ethyl benzoylacetate ester (**IVa**) was condensed with the appropriate aniline (**IVb**) in the presence of acid and the enamine obtained was cyclized by heating at 260-280° to give the corresponding 2-phenyl-4-hydroxyquinoline (**IVc**).

c) The hydroxyquinoline (IVc) was converted into chloroquinoline (Ivd) with $POCl_3$

The transformation of the chloroquinoline into the substituted proline via alkylation (addition-elimination) is not described in section B (synthesis of P2). It should be added to B2 (R^{2A} is aryl).

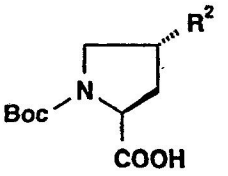
Alternatively, the compounds can be prepared via alkylation of BOC-4(S)-hydroxyproline with a chloroquinoline in the presence of a base such as potassium *tert*-butoxide.



A specific embodiment of this process is presented in Example 5.

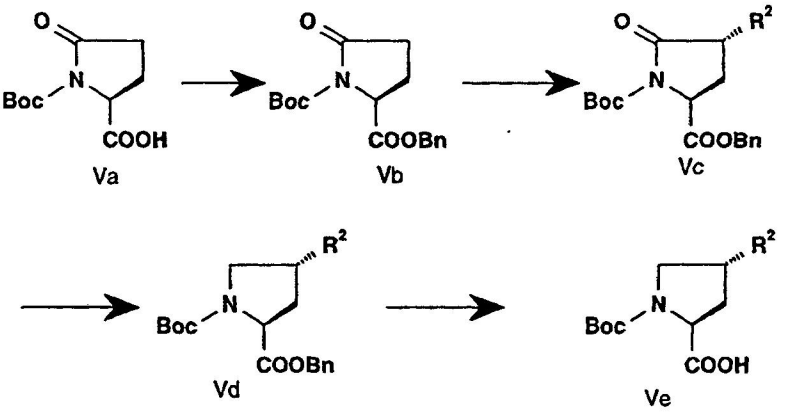
2. Synthesis of P2:

A) The synthesis of 4-substituted proline (wherein R^2 is attached to the ring via a carbon atom) (with the stereochemistry as shown):



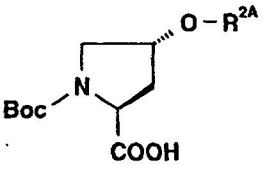
is done as shown in Scheme IV according to the procedures described by J. Ezquerra et al. (Tetrahedron, (1993), 38, 8665-8678) and C. Pedregal et al. (Tetrahedron Lett., (1994), 35, 2053-2056).

Scheme V



Briefly, Boc-pyroglutamic acid is protected as a benzyl ester. Treatment with a strong base such as lithium diisopropylamide followed by addition of an alkylating agent (Br-R^2 or I-R^2) gives the desired compounds **Ve** after reduction of the amide and deprotection of the ester.

B) The synthesis of O-alkylated 4-*(R)*-hydroxyproline:

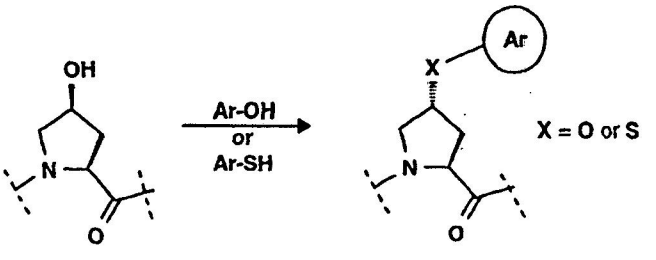


may be carried out using the different processes described below.

B.1) When R^{2A} is aralkyl, the process can be carried out according to the procedure described by E.M. Smith et al. (J. Med. Chem. (1988), 31, 875-885). Briefly, commercially available Boc-4(*R*)-hydroxyproline is treated with a base such as sodium hydride and the resulting alkoxide reacted with an alkylating agent (Br-R^{2A} or I-R^{2A}) to give the desired compounds. Specific embodiments of this process are presented in Examples 4 and 5.

B.2) When R^{2A} is aryl, the compounds can be prepared via a Mitsunobu reaction (Mitsunobu (1981), Synthesis, 1-28; Rano *et al.*, (1995), Tet. Lett. 36 (22), 3779-3792; Krchnak *et al.*, (1995), Tet. Lett. 36 (5), 62193-6196; Richter *et al.*, (1994), Tet. Lett. 35 (27), 4705-4706). Briefly, commercially available Boc-4(*S*)-hydroxyproline methyl ester is treated with the appropriate aryl alcohol or thiol in the presence of triphenylphosphine and diethylazodicarboxylate (DEAD) and the resulting ester is hydrolyzed to the acid.

Scheme VI



Va Vb

Alternatively, the Mitsunobu reaction can be carried out in solid phase (Scheme V). The 96-well block of the Model 396 synthesizer (advanced ChemTech) is provided with aliquots of resin-bound compound (**Va**) and a variety of aryl alcohols or thiols and appropriate reagents are added. After incubation, each resin-bound product (**Vb**) is washed, dried, and cleaved from the resin.

B.2.a) A Suzuki reaction (Miyaura *et al.*, (1981), Synth. Comm. 11, 513; Sato *et al.*, (1989), Chem. Lett., 1405; Watanabe *et al.*, (1992), Synlett., 207; Takayuki *et al.*, (1993), J. Org. Chem. 58, 2201; Frenette *et al.*, (1994), Tet. Lett. 35 (49), 9177-9180; Guiles *et al.*, (1996), J. Org. Chem. 61, 5169-5171) can also be used to further functionalize the aryl substituent.

EXAMPLES

The present invention is illustrated in further detail by the following non-limiting examples. Other specific ways of synthesis or resolution can be found in co-pending application 09/219,939.

Temperatures are given in degrees Celsius. Solution percentages express a weight to volume relationship, and solution ratios express a volume to volume relationship, unless stated otherwise. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer; the chemical shifts (δ) are reported in parts per million. Flash chromatography was carried out on silica gel (SiO_2) according to Still's flash chromatography technique (W.C. Still et al., J. Org. Chem., (1978), 43, 2923).

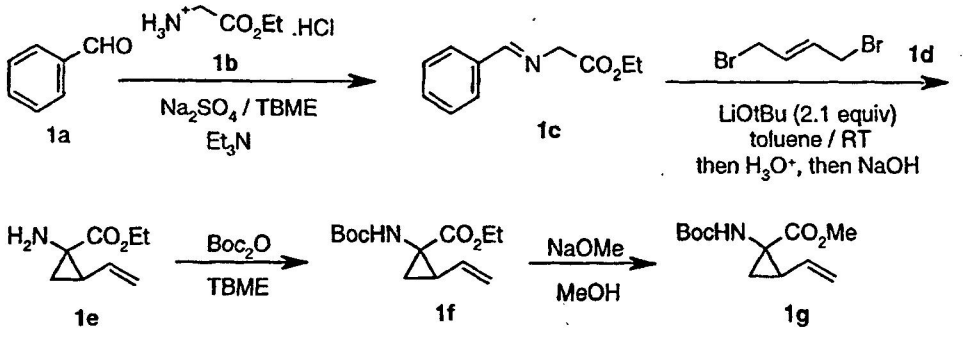
Abbreviations used in the examples include Bn: benzyl; Boc: *tert*-butyloxycarbonyl {$Me_3COC(O)$}; BSA: bovine serum albumin; CHAPS: 3-[(3-

cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene; CH_2Cl_2= DCM: methylene chloride; DEAD: diethylazodicarboxylate; DIAD: diisopropylazodicarboxylate; DIPEA: diisopropylethylamine; DMAP: dimethylaminopyridine; DCC: 1,3-dicyclohexylcarbodiimide; DME: 1,2-dimethyoxyethane; DMF: dimethylformamide; DMSO: dimethylsulfoxide; DTT: dithiothreitol or threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol; DPPA: diphenylphosphoryl azide; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; Et: ethyl; EtOH: ethanol; EtOAc: ethyl acetate; Et_2O: diethyl ether; HPLC: high performance liquid chromatography; MS: mass spectrometry (MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Disorption Ionization-Time of Flight, FAB: Fast Atom Bombardment); LAH: lithium aluminum hydride; Me: methyl; MeOH: methanol; MES: (2-{N-morpholino}ethane-sulfonic acid); NaHMDS: sodium bis(trimethylsilyl)amide; NMM: N-methylmorpholine; NMP: N-methylpyrrolidine; Pr: propyl; Succ: 3-carboxypropanoyl; PNA: 4-nitrophenylamino or p-nitroanilide; TBAF: tetra-n-butylammonium fluoride; TBTU: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate; TCEP: tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; TFA: trifluoroacetic acid; THF: tetrahydrofuran; TIS: triisopropylsilane; TLC: thin layer chromatography; TMSE: trimethylsilylethyl; Tris/HCl: tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride.

P1 MOIETIES

EXAMPLE 1

Synthesis of methyl-(*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1-amino-2-vinylcyclopropyl carboxylate (1g):



Glycine ethyl ester hydrochloride **1b** (1519.2 g, 10.88 mole, 1.0 equiv) was suspended in tert-butylmethyl ether (8 L). Benzaldehyde (**1a**) (1155 g, 10.88 mole, 1 equiv) and anhydrous sodium sulfate (773 g, 5.44 mole, 0.5 equiv) were added and the mixture cooled to 5° in an ice-water bath. Triethylamine (2275 mL, 16.32 mole, 1.5 equiv) was added dropwise over 15 min (use 0.5 L of tert-butylmethyl ether for rinses) and the mixture stirred for 40 h at RT. The reaction was then quenched by addition of ice-cold water (5 L) and the organic layer was separated. The aqueous phase was extracted with tert-butylmethyl ether (1 L) and the combined organic phases washed with a mixture of saturated $NaHCO_3$ (400 mL) and water (1.6 L), and then brine. The solution was dried over $MgSO_4$, concentrated under reduced pressure and the residual yellow oil dried to constant weight under vacuum. Imine **1c** was obtained as a thick yellow oil that solidifies at ~20° (2001 g, 96% yield). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.30 (s, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.48-7.39 (m, 3H), 4.40 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 7Hz, 2H), 1.31 (t, J = 7 Hz, 3H).

Lithium tert-butoxide (4.203 g, 52.5 mmol, 2.1 equiv) was suspended in dry toluene (60 mL). Imine **1c** (5.020 g, 26.3 mmol, 1.05 equiv) and dibromide **1d**

(5.348 g, 25 mmol, 1 equiv) were dissolved in dry toluene (30 mL) and this solution added dropwise over 30 min to the stirred solution of LiOtBu at RT. After completion, the deep red mixture was stirred for an additional 10 min and quenched by addition of water (50 mL) and tert-butylmethyl ether (TBME, 50 mL). The aqueous phase was separated and extracted a second time with TBME (50 mL). The organic phases were combined, 1 N HCl (60 mL) was added and the mixture stirred at RT for 2 h. The organic phase was separated and extracted with water (40 mL). The aqueous phases were then combined, saturated with salt (35 g) and TBME (50 mL) was added. The stirred mixture was then basified to pH 13-14 by careful addition of 10 N NaOH. The organic layer was separated and the aqueous phase extracted with TBME (2 × 50 mL). The organic extracts containing free amine **1e** were combined and ditertbutyldicarbonate (5.46 g, 25 mmol, 1 equiv) was added. After stirring overnight at RT, TLC showed some unreacted free amine. Additional ditertbutyldicarbonate (1.09 g, 5 mmol, 0.2 equiv) was added and the mixture refluxed for 2 h, at which point, TLC analysis indicated complete conversion of **1e** to carbamate **1f**. The solution was cooled to RT, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using 10% then 20% EtOAc / hexane as eluent. Purified **1f** was obtained as a clear yellow oil which slowly solidifies under vacuum (4.014 g, 63% yield).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.77 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5.28 (dd, J = 17, 1.5 Hz, 1H), 5.18 (broad s, 1H), 5.11 (dd J = 10, 1.5 Hz, 1H), 4.24-4.09 (m, 2H), 2.13 (q, J = 8.5 Hz, 1H), 1.79 (broad m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.26 (t, J = 7 Hz, 3H).

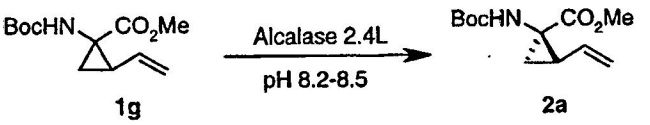
The ethyl ester **1f** (10.807 g, 42.35 mmol) was dissolved in dry methanol (50 mL) and a solution of sodium methoxide in MeOH (25 % w/w, 9.7 mL, 42 mmol, 1 equivalent) was added. The mixture was heated at 50° for 2 h, at which point TLC analysis indicated complete trans-esterification (**1f** Rf 0.38,

1g Rf 0.34 in 20% EtOAc/hexane). The reaction mixture was cooled to RT and acidified to pH 4 using 4N HCl in dioxane. Precipitated NaCl was removed by filtration (use tert-butylmethyl ether for washings) and volatiles removed under reduced pressure. Tert-Butylmethyl ether (100 mL) was added to the residue and solids removed by filtration. Evaporation of the filtrate under reduced pressure and drying under vacuum gave pure methyl ester **1g** (10.11 g, 99% yield).

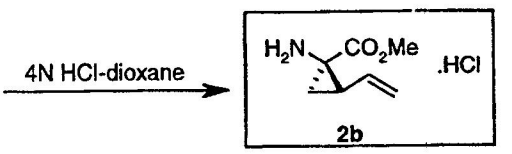
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.75 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5.28 (dd, J = 17, 1 Hz, 1H), 5.18 (broad s, 1H), 5.11 (ddd, J = 10, 1.5, 0.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.14 (q, J = 9 Hz, 1H), 1.79 (broad m, 1H), 1.50 (broad m, 1H), 1.46 (s, 9H).

EXAMPLE 2

Enzymatic resolution of methyl *(1R,2S)/(1S,2R)*- 1-amino-2-vinylcyclopropyl carboxylate (preparation of 2b from 1g):



1g 2a



2b

The racemic ester **1g** (0.200 g, 0.83 mmol) was dissolved in acetone (3 mL) and water (7 mL) was added. 0.05 M NaOH (1 drop) was added to bring the pH of the solution to ~8 and then Alcalase® 2.4L (Novo Nordisk Biochem, 0.3 g in one mL of water) was added. The mixture was stirred vigorously at RT, maintaining the pH of the solution at 8 using an automatic titrator. At beginning of day 4 and 5 of stirring at pH 8, additional enzyme solution was added (2 × 0.3 g). After a total of 5 days, a total of 8.3 mL of 0.05 M NaOH was consumed. The reaction mixture was diluted with EtOAc and water and the organic phase separated. After washing with brine, the organic extract

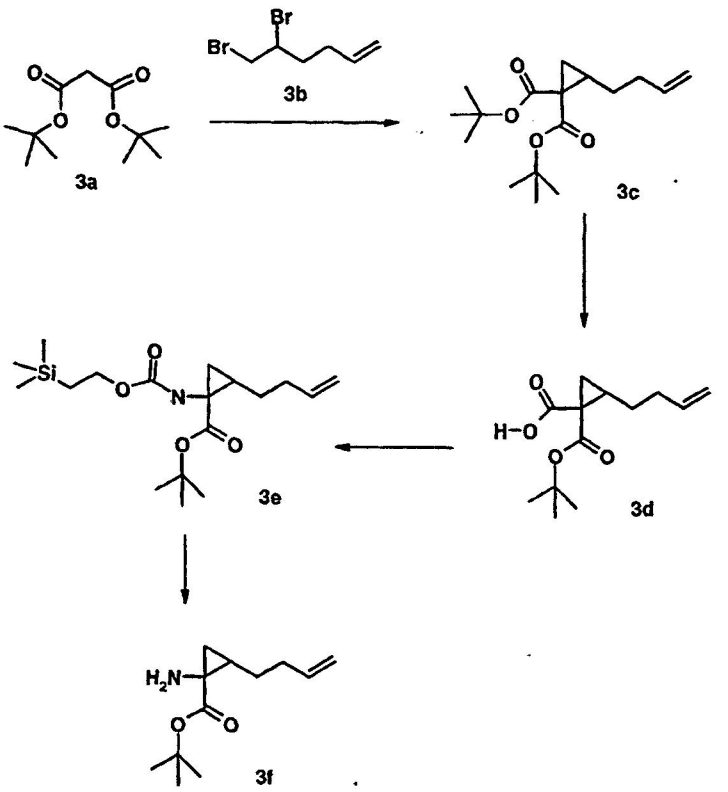
was dried ($MgSO_4$) and concentrated under vacuum. Compound **2a** (0.059 g, 30% yield) was obtained as a clear oil.
^{1}H NMR identical to that of compound **1g**.

HPLC (Chiralcel ODH, 4.6 × 250 mm, isocratic 1% EtOH in hexane, 0.8 mL/min flow rate): (1R,2S)-**2a** Rt 19.3 min (97%); (1S,2R)-**2a** Rt 17.0 min (3%).

Compound **2a** (39.96 g, 165.7 mmol) was dissolved in dioxane (25 mL) and the solution added dropwise with stirring to 4 N HCl in dioxane (Aldrich, 250 mL). After 45 min, TLC analysis indicated complete deprotection. Volatiles were removed under reduced pressure, and the residue co-evaporated twice with MeOH (2 × 100 mL). Ether (300 mL) and MeOH (10 mL) were added to the brown, oily residue and the mixture stirred overnight at RT resulting in the precipitation of a semi-solid. Additional MeOH (15 mL) was added and stirring continued for 6 h, at which point a yellowish solid was collected by filtration. The product was washed with 5% MeOH in ether (50 mL) and ether (2 × 50 mL), and dried *in vacuo* to give compound **2b** as a yellowish solid (22.60 g, 76% yield). Filtrates (including washings) were evaporated in vacuum to give additional **2b** as a brown oil (7.82 g, 26% yield). Both fractions were pure enough for use in the synthesis of HCV protease inhibitors: $[\alpha]_D^{25}$ +38.2° (c 1.0, MeOH). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.15 (broad s, 3H), 5.65 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5.36 (dd, J = 17, 1.5 Hz, 1H), 5.19 (dd, J = 10, 1.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.50 (q, overlap with DMSO signal, J = 9 Hz, 1H), 1.86 (dd, J = 10, 6 Hz, 1H), 1.64 (dd, J = 8, 6 Hz, 1H).

EXAMPLE 3

Synthesis of t-butyl-(*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1-amino-2-homoallylcyclopropyl carboxylate (3f):



To a suspension of benzyltriethylammonium chloride (5.08 g, 22.3 mmol.) in 50% aqueous NaOH (50 mL), 1,2-dibromo-5-hexene (**3b**, 8.10 g, 33.46 mmol) and di-t-butylmalonate (**3a**, 4.82 g, 22.30 mmol) were added in succession. The mixture was stirred vigorously at RT for 16 h, then diluted with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). The organic layer was further washed with H_2O (2 x 50 mL), brine/H_2O (2/1, 2 x 50 mL, dried over $MgSO_4$ and evaporated. The crude residue was purified by flash column chromatography on silica gel, using 3 to 5% EtOAc in hexanes as the eluent to obtain compound **3c** in 38% yield (2.48 g).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.19 (bd, J = 7.9 Hz, 2H), 1.25-1.33 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.47-1.60 (m, 1H), 1.75-1.82 (m, 1H), 2.14-2.22 (m, 2H),

4.93-5.50 (m, 2H), 4.96 (dm, J = 10.2 Hz, 1H), 5.18 (dm, J = 17.2 Hz, 1H).
ES(+)MS *m/z* 297 $(M+H)^+$.

To a suspension of potassium t-butoxide (5.75 g, 51.25 mmol) in anhydrous diethyl ether (150 mL) at 0°, H_2O was added (203 µL, 11.27 mmol) and the reaction mixture was stirred at 0° for 10 min. An ether solution of compound **3c** (2.48 g in 10 mL diethyl ether, 10.25 mmol) was added and the mixture was stirred at RT for 5 h. The mixture was diluted with ice-cold H_2O and extracted with diethyl ether (3 x 200 mL). The aqueous layer was acidified to pH 3.5-4 with ice-cold 10% aqueous citric acid and re-extracted with EtOAc (3 x 200 mL). The EtOAc layer was washed with H_2O (2 x 100 mL), brine (100 mL), died over $MgSO_4$ and evaporated to give compound **3d** in 85% yield based on the amount of recovered starting material.
^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.51 (s, 9H), 1.64-1.68 (m, 1H), 1.68-1.75 (m, 1H), 1.77-1.88 (m, 1H), 1.96-2.01 (m, 1H), 2.03-2.22 (m, 3H), 5.01 (dm, J = 6.4 Hz, 1H), 5.03 (dm, J = 14.9 Hz, 1H), 5.72-5.83 (m, 1H).
ES(+)MS: *m/z* 241 $(M+H)^+$.

To a solution of the acid **3d** in anhydrous benzene (1.14 g in 25 mL benzene, 4.74 mmol), Et_3N (800 µL, 5.68 mmol) was added, followed by the addition of diphenylphosphoryl azide (1.13 mL, 5.21 mmol) and the mixture was heated to reflux for 3.5 h. Subsequently, trimethylsilylethanol (1.36 mL, 9.48 mmol.) was added and stirring at reflux was continued for an additional 4 h. The mixture was then cooled to RT, evaporated to half of its original volume, diluted with diethyl ether (30 mL) and washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ (2 x 30 mL), brine (50 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated. The residual oil was chromatographed on silica gel using 10% EtOAc in hexanes as the eluent to obtain pure compound **3e** in 88% yield (1.49 g).
^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.03 (s, 9H), 0.91-0.99 (m, 2H), 1.18-1.29 (m, 2H), 1.45 (bs, 11H), 1.56-1.72 (m, 2H), 2.02-2.18 (m, 2H), 4.12 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 4.93

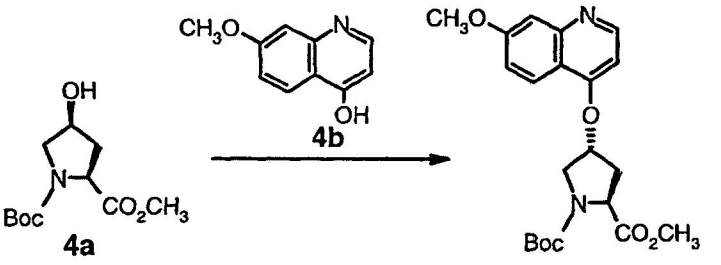
(dm, J = 10.2 Hz, 1H), 4.98 (dm, J = 17.2 Hz, 1H), 5.07 (bs, 1H), 5.71-5.83 (m, 1H).

To a solution of the cyclopropyl derivative **3e** (1.19 g, 3.35 mmol, in 30 mL THF), t-Bu_4NF (6.7 mL of 1M in THF, 6.7 mmol.) was added and the mixture was first stirred at RT for 16 h and subsequently heated to reflux for 15 min. The solvent was carefully evaporated under low pressure (due to the high volatility of the free amine **3f**, caution should be exercised during the evaporation of the solvent). The crude residue was re-dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (2x 50mL), brine (50mL), dried over $MgSO_4$ and again the solvent was carefully evaporated. The crude product **3f** was used for coupling with the P2 proline derivatives in without further purification.

P2 MOIETIES

EXAMPLE 4

Synthesis of Boc-4(*R*)-{(7-methoxy-4-quinolininyl)oxy}proline (4c):



4-Hydroxy-7-methoxyquinoline (**4b**) was prepared according to the method described by Chun, M.W.; Olmstead, K.K.; Choi, Y.S.; Lee, C.O.; Lee, C.-K.; Kim, J.H.; Lee, J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997, 7, 789. A solution of compound **4b** (1.88 g, 10.73 mmol) and DEAD (3.4 mL, 21.46 mmol) in

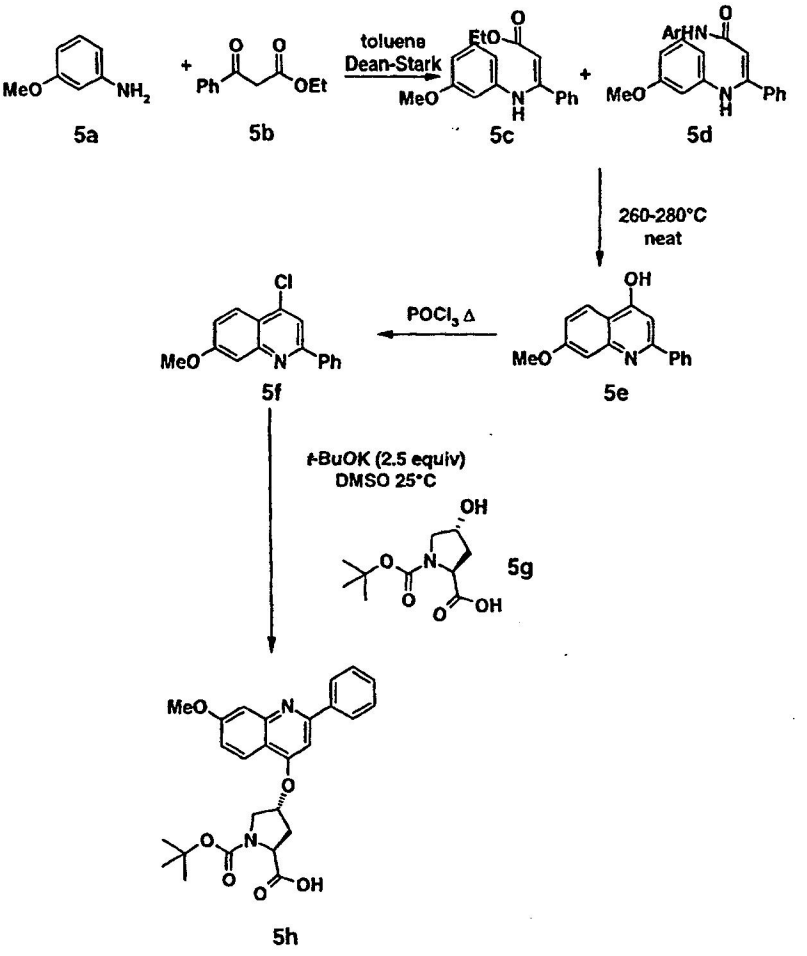
anhydrous THF were added to a stirring solution of *cis*-hydroxyproline **4a** (2.63 g, 10.73 mmol) and triphenylphosphine (5.63 g, 21.46 mmol) in anhydrous THF (160 mL) at 0° under N_2. The reaction mixture was allowed to warm-up to RT and stir for 14 h. The THF was then evaporated and the pure product **4c** was isolated after flash column chromatography using 5% MeOH in EtOAc as the eluent, in 35% yield (1.5 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H), 1.65 (bs, 1H), 2.34-2.43 (m, 1H), 2.63-2.76 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.75-3.85 & 3.89-3.99 (2m, 1H, 2 rotamers), 3.95 (s, 3H), 4.51 & 4.60 (2t, J = 8 Hz, 1H, 2 rotamers), 5.15 (bs, 1H), 6.53-6.59 (m, 1H), 7.12-7.18 (dd, J = 8.9 & 2.2 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.03 (bd, J = 9.2 Hz, 1H), 8.65 (bd, J = 5.1 Hz, 1H).

WO 2014/060564 PCT/EP2013/071605

EXAMPLE 5

Synthesis of Boc-4(R)-{2-phenyl-7-methoxy-4-quinolininyl)oxy} proline (5h):



4-Hydroxy-7-methoxy-2-phenylquinoline (5e):

A solution of ethyl benzoylacetate (5b) (100.0 g, 0.52 mol), m-anisidine (5a) (128.1 g, 1.04 mol) and 4 N HCl / dioxane (5.2 mL) in toluene (1.0 L) was refluxed for 6.25 h in a Dean-Stark apparatus. The cooled toluene solution was successively washed with aqueous 10% HCl (2 × 300 mL), 1 N NaOH (2 × 300 mL), H_2O (300 mL) and brine (150 mL). The toluene phase was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated under reduced pressure to give a 1.2:1.0 mixture of ester 5c and amide 5d (144.6 g, 45% / 38% crude yield) as a dark brown oil. The crude oil was heated to 280° for 80 min while distilling

generated EtOH. The cooled dark solid obtained was triturated with CH_2Cl_2 (200 mL). The suspension was filtered and the resulting solid washed with CH_2Cl_2 to give **5e** (22.6 g, 17% from **5a**) as a beige solid.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 8.00 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.81-7.82 (m, 2H), 7.57-7.59 (m, 3H), 7.20 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 3.87 (s, 3H).

4-Chloro-7-methoxy-2-phenylquinoline (**5f**):

A suspension of **5e** (8.31 g, 33.1 mmol) in $POCl_3$ (90 mL) was heated to reflux for 2 h (clear solution obtained upon heating). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between 1 N NaOH (exothermic, 10 N NaOH added to maintain high pH) and EtOAc (500 mL). The organic layer was washed with H_2O (100 mL) and brine (100 mL) then was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated under reduced pressure to give **5f** (8.60 g, 96%) as a pale yellow solid. This reaction was repeated three times and gave always 96-98% yield which is significantly higher that the 68% yield reported in J. Med. Chem. 1997, 40, 1794.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 8.28-8.30 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.10 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.54-7.58 (m, 3H), 7.52 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H).

1-{(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl}-4(R)-{(7-methoxy-2-phenyl-4-quinolinyl)oxy}-L-proline (**5h**):

Potassium tert-butoxide (8.16 g, 72.7 mmol) was added in small portions, over 15 min, to a solution of **5g** (6.73 g, 29.1 mmol) in DMSO (83 mL) maintained at 25°. The mixture was stirred at 25° for 1.5 h. Chloroquinoline **5f** (8.61 g, 32.0 mmol) was added in 4 portions over 15 min to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 25° for 19 h. The resulting suspension was poured in H_2O (650 mL) and the mixture was washed with Et_2O (3 × 150 mL) to remove excess chloroquinoline (EtOAc was later found

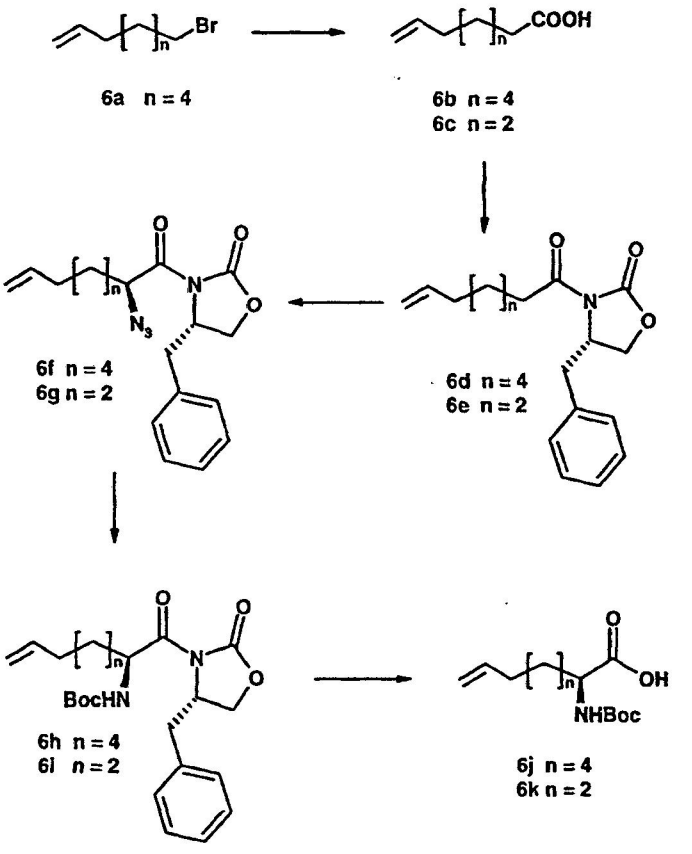
to be more efficient). The aqueous layer was acidified with aqueous 1 N HCl (38 mL of calculated 1.5 equiv. required, 43.6 mL) to pH 4 – 5. The white solid that precipitated was recovered by filtration. The moist solid was dried under reduced pressure over P_2O_5 to give the proline derivative **5h** (12.6 g, 91%, contains 2.3% w/w of DMSO) as a beige solid.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ (2:1 mixture of rotamers) 8.27 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 8.00, 7.98 (2d, J = 9.2, ~9.2 Hz, 1H), 7.48-7.56 (m, 3H), 7.45, 7.43 (2s, 1H), 7.39 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 5.53-5.59 (m, 1H), 4.34-4.41 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.76 (broad s, 2H), 2.63-2.73 (m, 1H), 2.32-2.43 (m, 1H), 1.36, 1.33 (2s, 9H).

PEPTIDE LINKER MOIETIES ("D")

EXAMPLE 6

Synthesis of N-Boc (2S)-2-amino alkenoic acids (6j & 6k):



To a stirred suspension of finely cut Mg ribbons (0.55 g, 22.5 mmol) in dry THF (30 mL) containing dibromoethane (0.1 mL), 8-bromo-1-octene (6a, 2.52 mL, 15 mmol) was added dropwise over a period of 15 min, [the reaction is slightly exothermic]. After 30 min, the mixture was heated to 38° for 1 h and then cooled to –78° before it was added via a cannula onto an excess amount of solid CO_2. The mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and the solution was washed with brine (2 x 50 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated. A crude oil was obtained which was purified by chromatography on silica gel using 15% EtOAc in hexanes as the eluent to

give compound **6b** in 62% yield(1.44 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.31-1.42 (m, 6H), 1.60-1.69 (m, 2H), 2.02-2.09 (m, 2H), 2.35 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 4.99 (dm, J = 10.0 Hz, 1H), 5.04 (dm, J = 17.0 Hz, 1H), 5.75-5.86 (m, 1H).

To a vigorously stirring solution of the carboxylic acid **6b** (1.36g, 8.7 mmol) in anhydrous THF (70 mL) at –78°, freshly distilled Et_3N (1.6 mL; 11.3 mmol) and pivaloyl chloride (1.18 mL, 9.58 mmol) were added via a syringe under anhydrous conditions. The mixture was stirred at –78° for 15 min and then at 0° for 45 min. The mixture was cooled again to –78° and then transferred via a cannula into an anhydrous solution of 4(*S*)-4-(phenylmethyl)-2-oxazolidinone lithium salt in THF at –78°; the lithium salt of the oxazolidinone reagent had been previously prepared by the slow addition of n-BuLi (2.00 M in hexanes, 7.85 mL, 15.7 mmol) into a THF (20 mL) solution of the oxazolidinone (2.78g, 15.7 mmol) in THF at –78°.
The reaction mixture was stirred at –78° for 15 min then at RT for 1.5 h. Finally, it was quenched with an aqueous solution of sodium bisulfate (100 mL of 1 M) and the THF evaporated to ¾ of its initial volume. The residue was extracted with EtOAc (2 x 150 mL) and the mixed organic layers were washed with 5% $NaHCO_3$ (3 x 50 mL), brined (2 x 50 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude oil was chromatographed on silica gel, using 15% EtOAc in Hexanes to obtain compound **6d** in 68% yield (1.88g).
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.35-1.47 (m, 6H), 1.67-1.74 (m, 2H), 2.02-2.09 (m, 2H), 2.65 (dd, J = 13.4 & 9.9 Hz, 1H), 2.84-3.02 (m, 2H), 3.31 (dd, J = 13.4 & 3.2 Hz, 1H), 4.13-4.22 (m, 2H), 4.62-4.71 (m, 1H), 4.93 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.00 (dd, J = 17.2 & 1.6 Hz, 1H), 5.75-5.84 (m, 1H), 7.18-7.38 (m, 5H).

The commercially available carboxylic acid **6c** was converted to compound **6e** following the same synthetic protocol as for the preparation of compound **6d** from **6b**..

To a stirred solution of KHMDS (0.8 M THF, 22 mL, 17.5 mmol) in dry THF (50 mL) at –78° was cannulated a solution of the acid derivative **6d** or **6e** (3.25g, 10.30 mmol) in dry THF (40 mL) at –78°. The mixture was stirred at –78° for 45 min. To this mixture, a solution of trizylazide (3.67g, 11.85 mmol) in dry THF (40 mL) at –78° was added. The mixture was stirred at –78° for 3 min then quenched with acetic acid (5 mL). Subsequently, it was stirred at RT for 1 h and 45 min and finally at 40° for 15 min. Most of the THF was evaporated. The residue was taken into EtOAc (100 mL) and the organic solution washed with H_2O (50 mL), 5% $NaHCO_3$ (3x 50 mL) and brine (50 mL). It was dried and evaporated. The oil obtained was chromatographed on silica gel using Hexane/CH_2Cl_2 (1/1) as the eluent to give compound **6f** or **6g** (2.47g, yield 67%).

6f: ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.32-1.45 (m, 6H), 1.45-1.8 (m, 1H), 1.65-1.73 & 1.75-1.88 (2, 2H, rotamers), 2.01-2.11 (m, 2H), 2.72-3.02 (m, 1H), 3.33 (dd, J = 13.4 & 3.2 Hz, 1H), 4.10-4.28 (m, 2H), 4.62-4.72 (m, 1H), 4.90-5.05 (m, 3H), 5.73-5.88 (m, 1H), 7.17-7.38 (m, 5H).

To a stirred solution of anhydrous $SnCl_2$ (2.61 g, 13.8 mmol) in anhydrous MeOH (80 mL), a solution of the azide **6f** or **6g** (2.45 g, 6.9 mmol) was cannulated at 0° in anhydrous MeOH (20 mL). The mixture was stirred at RT for 4 h. The MeOH was evaporated and the foamy material obtained was taken into dioxane/H_2O (100 µL/20 µL) and treated with Boc_2O (3.0 g, 13.8 mmol) and $NaHCO_3$ (2.89 g, 34.5 mmol) (pH adjusted to 8 with more $NaHCO_3$ if needed) and the mixture was stirred at RT for 16 h. Part of the dioxane was evaporated (~50%) and the residue was extracted twice with EtOAc. The organic solution was washed with brine (2 x 50 mL), dried and evaporated. The residue obtained was chromatographed on silica gel using 20-25% EtOAc in hexane as eluent to give the compound **6h** or **6i** (1.75 g, yield 60%).

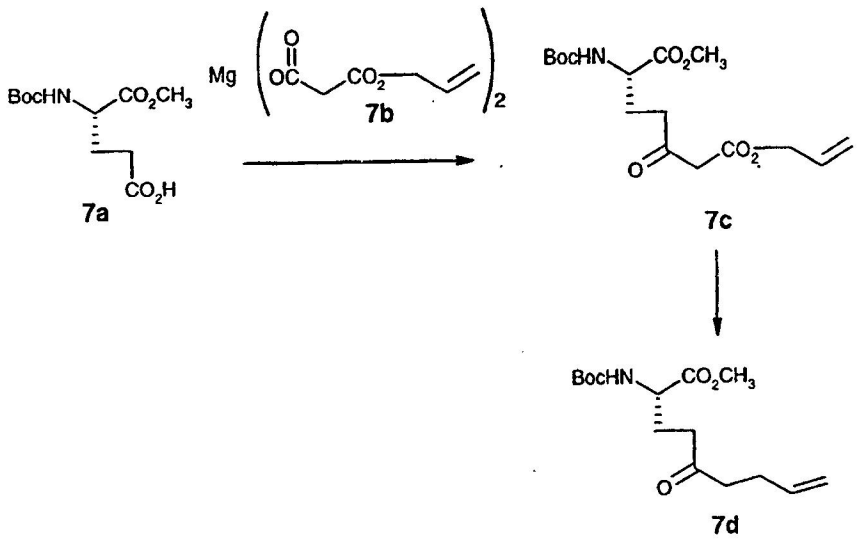
6h: ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.27-1.53 (m, 6H), 1.46 (s, 9H), 1.80 (m, 1H), 2.00-2.08 (m, 1H), 2.80 (t, J = 12.1 Hz, 1H), 3.34 (d, 14.3 Hz, 1H), 4.17-4.23 (m, 2H), 4.60-4.66 (m, 1H), 4.93 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 17.2 & 1.9 Hz, 1H), 5.13 (bs, 1H), 5.38-5.43 (m, 1H), 5.74-5.84 (m, 1H), 7.22-7.36 (m, 5H).

To a stirred solution at 90° of the n-Boc derivative **6h** or **6i** (1.74 g, 4.04 mmol) in THF/H_2O (75 μL/15 μL), H_2O_2 (30% v/w, 2.05 mL, 16.2 mmol) and LiOH.H_2O (0.34 g, 8.1 mmol) were added and the solution was stirred at 0° for 1 h. The reaction was quenched with Na_2SO_3 (2.24 g in H_2O, 15 mL, 17.8 mmol). The pH was adjusted to 4-5 with 10% aqueous citric acid and the mixture diluted with EtOAc. The aqueous fraction was extracted once more with EtOAc and the organic solution was washed twice with brine, dried and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel using 20% hexane in EtOAc as the eluent to give the free carboxylic acid **6j** or **6k** (0.76 g, yield 70%).

6j: ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.30-1.42 (m, 7H), 1.62 (s, 9H), 1.60-1.72 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 2.00-2.08 (m, 2H), 4.30 (bs, 1H), 4.94 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.00 (dd, J = 17.2 & 1.9 Hz, 1H), 5.73-5.85 (m, 1H).

EXAMPLE 7

Synthesis of N-Boc (2*S*)-2-amino-5-oxo-8-nonenoic acid methyl ester (7):



To a well stirred solution of the monoallyl acid of **7b** (1.50 g, 10.4 mmol) in dry THF under N_2 (20 mL) at –78° n-Bu_2Mg (0.9M/hexane, 5.8 mL, 5.2 mmol) was added dropwise over a period of 5 min. The heavy suspension was then stirred at RT for 1 h and evaporated (vacuum release under N_2). The solid Mg salt **7b**, was dried under vacuum for 1 h.

Compound **7a** was first mixed with 1-1-carbonylidiimidazole (1.65 g, 10.21 mmol) in anhydrous THF and the mixture was stirred at RT for 1 h in order to activate the free acid moiety. Subsequently, the activated glutamic acid derivative was cannulated into a solution of the Mg salt **7b** and the reaction mixture obtained was stirred at RT for 16 h. It was then diluted with EtOAc and the organic solution was washed with 0.5 N ice-cold HCl, brined, dried and evaporated. The residue obtained was chromatographed on silica gel using 35-40% EtOAc in hexane as eluent to give compound 7c (1.85 g, yield 53%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.44 (s, 9H), 1.85-1.95 (m, 1H), 2.12-2.22 (m, 1H), 2.58-2.74 (m, 2H), 3.48 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.24-4.34 (m, 1H), 4.52 (dm, J = 5.7 Hz, 2H), 5.09 (m, 1H), 5.25 (dm, J = 10.2 Hz, 1H), 5.34 (dm, J = 17.2 Hz, 1H),

5.91 (m, 1H).

To a stirred solution of tetrakis (triphenylphosphine) Pd (0) (0.116 g, 5 mol %, 0.1 mmole) in dry DMF (7 mL) was added (via a siring and under a N_2 atmosphere) the diester **7c** (0.687 g, 2 mmol) in dry DMF (3 mL). The mixture was stirred at RT for 3.5 h. The DMF was evaporated under reduced pressure and the residue diluted with EtOAc (20 mL). The EtOAc solution was washed with 0.5 N ice-cold HCl (5 mL), brine (10 mL), dried and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel using 15-20% EtOAc in hexane as eluent to give compound **7d** (0.253 g, yield 42%).
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.44 (s, 9H), 1.84-1.94 (m, 1H), 2.08-2.22 (m, 1H), 2.33 (dd, J = 14.0 & 7.3 Hz, 2H), 2.45-2.55 (m, 4H), 3.74 (s, 3H), 4.28 (bm, 1H), 4.98 (dm, J = 10.2 Hz, 1H), 5.03 (dm, J = 17.2 Hz, 1H), 5.00-5.10 (m, 1H), 5.74-5.85 (m, 1H).

MACROCYCLIC PEPTIDES

EXAMPLE 8

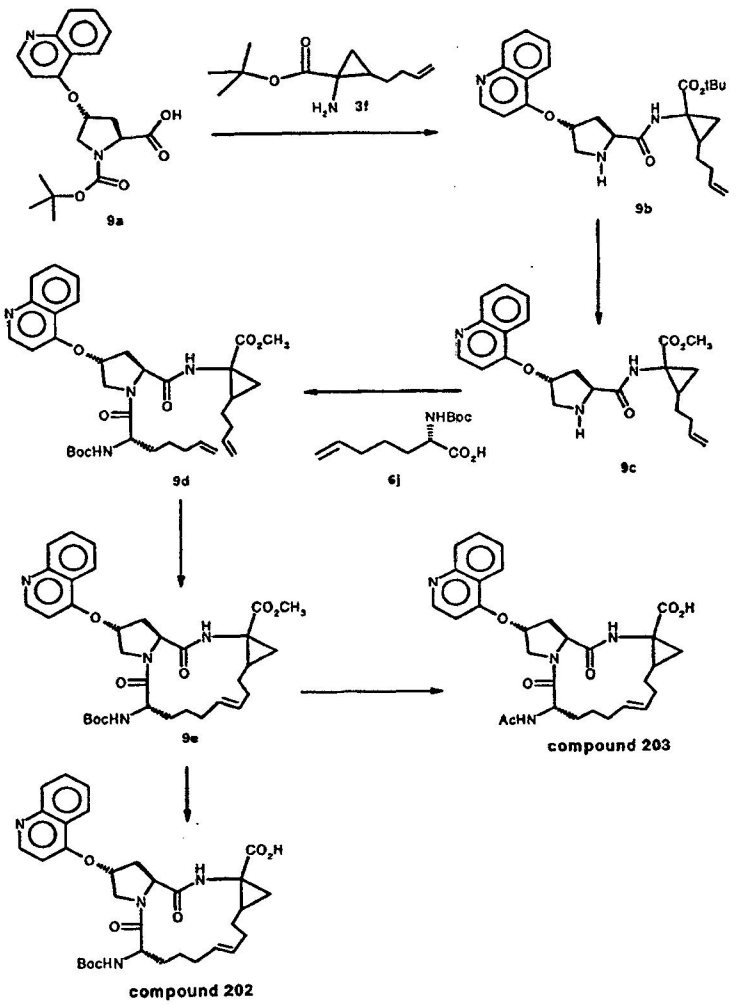
General procedure for coupling reactions done in solution {See also R. Knorr et al., Tetrahedron Letters, (1989), 30, 1927.}

The reactants, i.e. a free amine (1 eq.) (or its hydrochloride salt) and the free carboxylic acid (1 eq.) were dissolved in CH_2Cl_2, CH_3CN or DMF. Under a nitrogen atmosphere, four equivalents of *N*-methylmorpholine and 1.05 equivalents of the coupling agent were added to the stirred solution. After 20 min, one equivalent of the second reactant, i.e. a free carboxylic acid was added. (Practical and efficient coupling reagents for this purpose are (benzotriazol-1-yloxy)tris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (HOBT) or preferably 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) or O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate

(HATU). The reaction was monitored by TLC. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc. The solution was washed successively with 10% aqueous citric acid, saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated under reduced pressure. When the residue was purified, it was done by flash chromatography as defined above.

EXAMPLE 9

Synthesis of compound 202 & 203 (Table 2)



To a solution of the proline derivative **9a** (1.32 g, 3.68 mmol) and the crude homoallyl ACCA **3f** obtained previously (~3.35 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL), NMM (1.21 mL, 10.05 mmol) and HATU (1.53, 4.02 mmol) were added in succession and the suspension was stirred at RT for 18 h. After that period, the solvent was evaporated and the crude reaction mixture was redissolved in EtOAc (30 mL). The solution was washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ (2 x 10 mL), brine (10 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated. The crude product was purified my chromatography on silica gel using 8% diethyl ether in EtOAc as the eluent to obtain the desired diastereomer of compound **9b** in 20% yield (the absolute stereochemistry was not determined).
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0.93 & 1.01 (t, J = 8.3 Hz, 1H, rotamers in ratio of 3:7), 1.14-1.35 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.50-1.82 (m, 4H), 2.08-2.24 (m, 2H), 2.32 (bs, 0.7H), 2.63 (bs, 0.75H), 2.93 (bs, 0.75H), 3.16 (m, 0.25H), 3.77 (bs, 1.5H), 3.88 (bs, 0.5H), 4.4-4.55 (m, 1H), 4.98 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.03 (dd, J = 17.2 & 1.6 Hz, 1H), 5.24 (bs, 1H), 5.75-5.88 (m, 1H), 6.57 & 6.78 (2bs, 1H, 2 rotamers), 7.42-7.58 (m, 3H), 7.63-7.73 (m, 2H), 8.04 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 5.1 Hz, 1H).

To a solution of the dipeptide **9b** (137 mg, 0.248 mmol) in dry CH_2Cl_2, a solution of HCl in dioxane (4M, 4 mL) was added and the mixture was stirred at RT for 1.5 h. The solvent was then evaporated and the residue dried under high vacuum. The mixture was dissolved in diethyl ether/MeOH (3 μL/2 μL) and treated with a slight excess of diazomethane dissolved in diethyl ether. After 30 min, the excess diazomethane was destroyed with the addition of HCl (4M in dioxane) and the mixture was evaporated to dryness to obtain the HCl salt of compound **9c** which was used in the next step without any purification.

To a stirred suspension of the crude dipeptide **9c** (0.23 g, 0.48 mmole) in

237
232

CH_2Cl_2 (25 mL) was added in succession the (*S*)-N-Boc-amino acid **6j** (0.151 g, 0.62 mmol), NMM (210 µL, 1.91 mmol) and HATU (0.236 g, 0.62 mmole) and the mixture was stirred at RT for 16 h (the pH was adjusted to ~8 with NNM after 1 h if needed). The CH_2Cl_2 was evaporated, the residue taken into EtOAc (50 mL) and the organic solution washed with 5% $NaHCO_3$ (2 x 20mL), brine (2 x 20mL), dried and evaporated. The crude compound obtained was chromatographed on silica gel (50 mL, 2% EtOH/EtOAc) to give compound **9d** (0.139 g, yield 46%).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, rotamers in 6:1 ratio) chemical shifts of major rotamer δ 1.21-1.27 (m, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.45-1.81 (4m, 7H), 2.20-2.22 (m, 4H), 2.28-2.37 (m, 1H), 2.90-2.99 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.94-3.98 (m, 1H), 4.29 (bd, J = 9.9 Hz, 1H), 4.46-4.50 (m, 1H), 4.81 (dd, J = 8.3 & 5.4 Hz, 1H), 4.92-5.06 (m, 4H), 5.16 (d, J = 8.3 Hz 1H), 5.37 (m, 1H), 5.70-5.84 (m, 2H), 6.82 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.47-7.55 (m, 2H), 7.71 (dt, J = 7.0 & 1.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.78 (d, J = 5.1 Hz, 1H).

The diene compound **9d** (0.130 g, 0.205 mmol) was cyclized using catalytic amounts of bis-(tricyclohexylphosphine) benzylidene ruthenium IV dichloride (52 mg, 0.064 mmol) in CH_2Cl_2 (60 mL) under reflux for 2 h to give after chromatography on silica gel (50 mL, 3% EtOH/EtOAc) compound **9e** (60.1 mg, yield 48%).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.22-1.30 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.44-1.2.35 (m, 13H), 3.07-3.14 & 3.16-3.24 (2m, 1H, rotamers in 1:3 ratio), 3.69 (s, 3H), 4.42-4.50 (m, 1H), 4.95-5.04 (m, 1H), 5.05-5.15 (m, 1H), 5.20-5.30 (m, 1H), 5.55-5.65 (m, 1H), 6.75-6.79 (2d, J = 5.4 Hz, 1H, rotamers in 1:3 ratio), 7.36 (s, 1H), 7.46-7.50 (m, 1H), 8.00 (dd, J = 7.0 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.13 & 8.17 (2d, J = 8.0 Hz, 1H, rotamers in 1:3 ratio), 8.77 (d, J = 5.1 Hz, 1H).

The ester moiety of the macrocyclic compound **9e** (0.0156 g, 0.026 mmol) was hydrolyzed with $LiOH.2H_2O$ (8.7 mg, 0.206 mmol) in THF/MeOH/H_2O (4

WO 2004/014926 PCT/US2003/024854

mL /2 mL /2 mL). The crude product was purified by C18 reversed phase HPLC on a Whatman (Partisil 10,0DS3) 50/2.4 cm column using a solvent gradient from 5% aqueous CH_3CN to 100% CH_3CN to obtain pure compound 202 as an amorphous white solid (11.8 g).

^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1.12 (s, 9H), 1.20-1.24 (m, 2H), 1.32-1.40 (m, 3H), 1.58-1.62 (m, 2H), 1.68-1.78 (m, 3H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.08-2.18 (m, 2H), 2.42-2.59 (m, 2H), 3.97-3.40 (bd, J = 9.8 Hz, 2H), 4.47 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 5.22-5.29 (m, 1H), 5.46-5.54 (m, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.12 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 7.68 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.98 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.35 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 9.08 (d, J = 5 Hz, 1H).

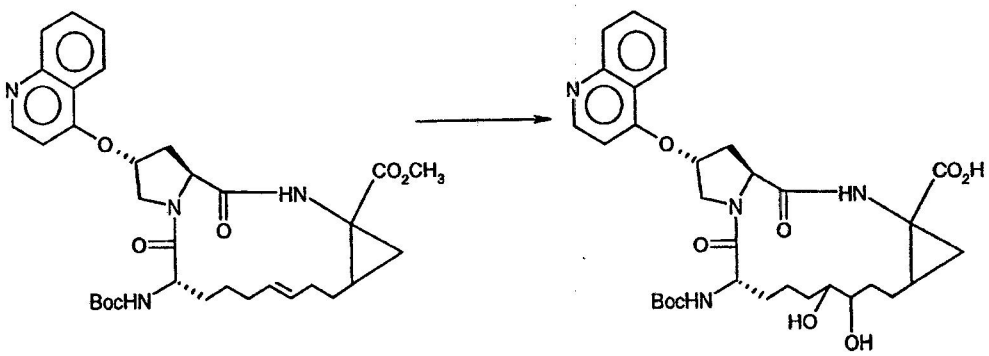
The macrocyclic compound **9e** (20 mg, 0.033 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1 mL) was stirred in presence of 4M HCl/dioxane (5 mL) for 1 h. The mixture was evaporated and dried carefully. The residue was re-dissolved in CH_2Cl_2/DMF (3 mL /1 mL) and treated with NMM (14.5 µL, 0.132 mmol) and acetic anhydride (7.0 µL, 0.073 mmol) and stirred at RT for 14 h. The mixture was evaporated and dried under high vacuum. The residue was then dissolved in a mixture of THF/MeOH/H_2O (4 mL / 2 mL / 2 mL) and stirred overnight with LiOH.$2H_2O$ (11 mg, 0.264 mmol). The residue isolated after acidification to pH = 3 with 1N ice-cold HCl was purified by C18 reversed phase HPLC using a solvent gradient from 0-40% aqueous CH_3CN (0.06% TFA) in order to isolated pure compound **203** as an amorphous white solid (12 mg).

^1H NMR (50mM Na_2PO_4 buffer, pH=6.0, 600 MHz): δ 1.22-1.27 (m, 2H), 1.38-1.43 (m, 2H), 1.58-1.64 (m, 2H), 1.67-1.76 (m, 2H), 1.77-1.84 (m, 1H), 1.92-1.99 (m, 1H), 2.22-2.08 (m, 1H), 2.12-2.27 (m, 1H), 2.22-2.27 (m, 1H), 2.60-2.67 (m, 1H, Pro-β'), 2.83-2.89 (m, 1H, Pro-β), 4.32 (dd, J = 12.1 & 3.5 Hz, 1H, Pro-δ'), 4.41 (dd, J = 12.1 & 7.3 Hz, 1H), 4.56 (bd, J = 8.0 Hz, 1H, Pro-δ), 4.62 (dd, J = 8.9 Hz, 1H, Pro-α), 5.40-5.46 (m, 1H), 5.55-5.61 (m, 1H), 5.73 (bs, 1H, Pro-γ),

7.41 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.64 (bs, 1H, Acca-NH), 7.80 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 8.03 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 7 Hz, 1H, AcNH), 8.36 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 6.0 Hz, 1H).

EXAMPLE 10

Synthesis of compound 204 and 205 (Table 2)



compound **202** compounds **204/205**

To a solution of the macrocyclic compound **9e** (21 mg, 0.035 mmol) in t-butanol/H_2O) (1.5 mL/1.5 mL) at 0°, a solution of OsO_4 in t-butanol (0.36 mL of a 35% w/v, 0.035 mmol) was added and the mixture was stirred at RT for 1 h. The mixture was diluted with EtOAc (20 mL) and the organic solution washed with 5% $NaHCO_3$ (2 x 10 mL), brined (2 x 10mL), dried and evaporated to dryness. The crude compound was taken into THF/MeOH/H_2O (3 mL / 1.5 mL / 1.5 mL) and stirred in presence of $LiOH.2H_2O$ (13 mg, 0.28 mmol) for 16 h. The mixture was acidified to pH 4 with 0.5 N ice-cold HCl, evaporated and purified by C18 reversed phase HPLC using a solvent gradient from H_2O (0.06%TFA) to 40% aqueous CH_3CN (0.06% TFA). The two syn diols **204** and **205** were isolated in high purity as amorphous white solids.

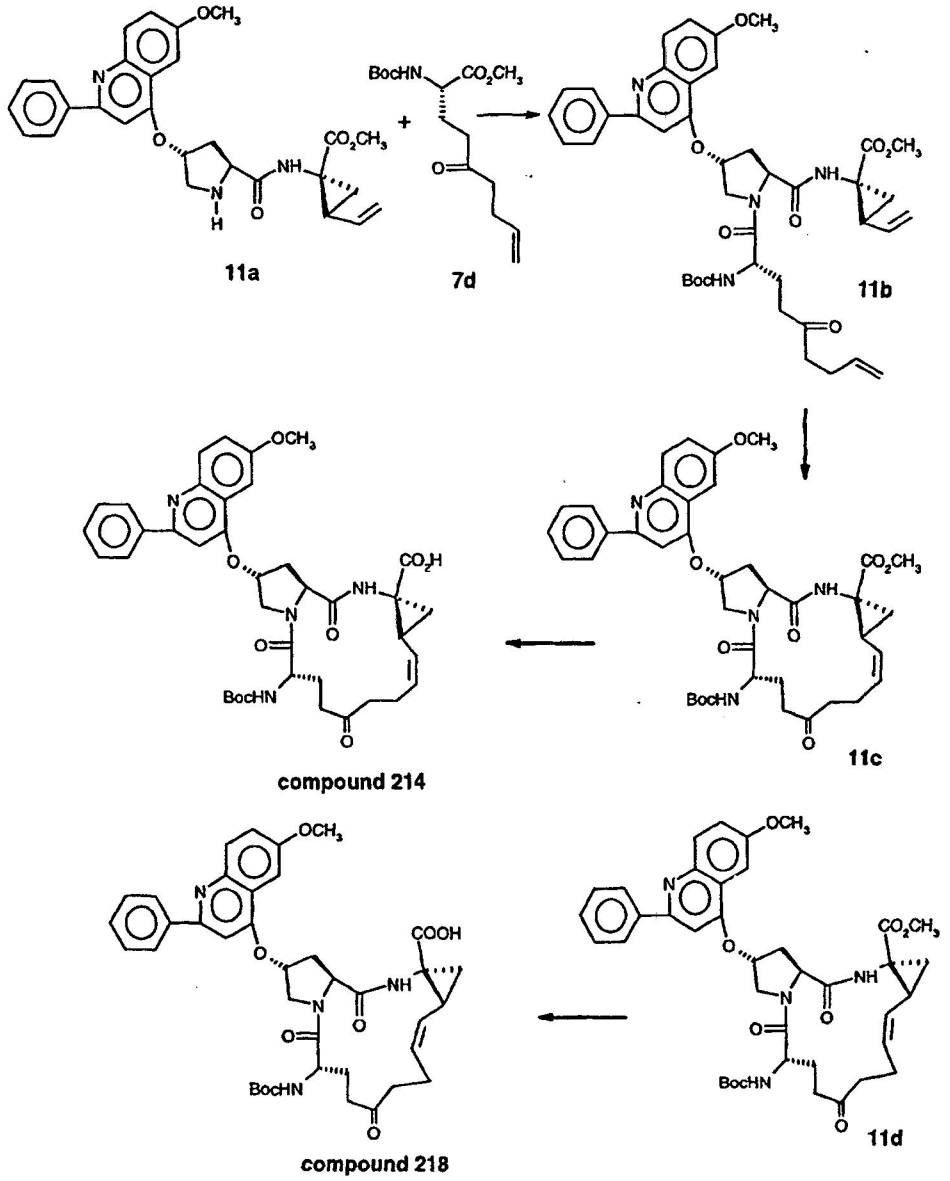
204: ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1.16 (s, 9H), 0.95-1.55 (4m, overlapping, 10H), 1.56-1.68 (m, 2H), 1.83-1.93 (m, 1H), 2.27-2.38 & 2.45-2.58 (2m, 2H, Pro-2β), 3.15-3.25 (m, 1H), 3.35-3.50 (m, 1H), 3.85 (d, J = 10.0 Hz, 1H, Pro-δ), 4.05

(bs, 1H), 4.42-4.58 (m, 2H, Pro-α & Pro-δ), 5.62 (bs, 1H, Pro-γ), 6.80 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.43 (bs, 1H), 7.65-7.75 (m, 1H), 7.92-8.01 (m, 1H), 8.05-8.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 9.06 (d, J = 4.1 Hz, 1H).
ESMS (negative ionization mode): m/z 625 $(M-H)^-$.

205: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1.01 (s, 9H), 1.06-1.30 (m, 9H), 1.48-1.68 (m, 3H), 1.78-1.88 (m, 1H), ≈2.2-2.5 (2m, 2H), 3.78-3.82 (m, 1H), 3.86-3.90 (m, 1H), 4.39 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 5.60 (bs, 1H, Pro-γ), 7.03 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.40 (bs, 1H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.87-7.91 (m, 1H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.99 (bs, 1H).
EMS (negative ionization mode): m/z 625 $(M-H)^-$.

EXAMPLE 11

Synthesis of compound 214 & 218 (Table 2)



A solution of the keto-nonenoate ester **7d** (0.180 g, 0.6 mmol) in MeOH/H_2O (5 mL / 2 mL) was stirred at RT in presence of LiOH.2H_2O (50 mg, 1.2 mmol) for 1 h. The solution was acidified to pH 6 with 0.5 N ice-cold HCl and most of the MeOH was evaporated. The residue was then dissolved in EtOAc (30 mL) and the solution was washed with 0.5 N ice-cold HCl (10 mL),

brined (10 mL), dried and evaporated. The crude residue was then re-dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and reacted with the P1-P2 fragment **11a** (0.337 g, 0.6 mmol) in the presence of HATU (233 mg, 0.612 mmol) and DIPEA (420 µL, 2.4 mmol) over a period of 16 h at RT. The reaction mixture was chromatographed on silica gel using EtOAc/hexane (1/1) as the eluent, to isolate the pure compound **11b** (0.370 g, yield 83%, Purity >95% by HPLC). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.41 (s, 9H), 1.45-1.54 (m, 1H), 1.58-1.62 (m, 1H), 1.73-1.77 (m, 1H), 1.86-1.91 (m, 1H), 2.16 (dd, J = 17.8 & 8.6 Hz, 1H), 2.26-2.43 (2m, 2H), 2.46-2.58 (m, 2H), 2.64-2.81 (m, 1H), 2.85-2.92 & 2.95-3.03 (2m, 1H, rotamers in 1:3 ratio), 3.67 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.10-4.18 (m, 1H), 4.20-4.30 (m, 1H), 4.40-4.55 (m, 1H), 4.80-4.88 (m, 1H), 4.92-5.10 (m, 2H), 5.14 (dd, J = 10.2 & 1.6 Hz, 1H), 5.24-5.38 (m, 4H), 5.42-5.54 (m, 1H), 5.68-5.86 (m, 2H), 7.04-7.14 (m, 2H), 7.42-7.64 (m, 5H), 7.92-8.12 (m, 3H).

The diene **11b** (0.370 g, 0.49 mmol) was cyclized in the presence of the bis-(tricyclohexylphosphine) benzylidene ruthenium IV dichloride catalyst (0.125 mg, 0.15 mmol) in CH_2Cl_2 (distilled from CaH_2 and degassed with argon for 30 min) over a period of 2 h at reflux. The compound was obtained as a mixture of stereoisomers (**11c** and **11d** 1:1 ratio) after flash column chromatography on silica gel using EtOAc/Hexane (3/1) in 35% yield (0.124 g).

^{1}H NMR of mixture **11c & 11d** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.44 (s, 4H) & 1.37 (s, 4H), 1.60 (m, 2H), 1.83 (m, 0.5H), 2.01 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 2.42 (m, 5H), 2.73 (m, 2H), 3.26 (m, 0.5H), 3.69 (s, 1.5H), 3.76 (s, 1.5H), 3.96 (s, 3H), 4.10 (m, 1H), 4.24 (m, 0.5H), 4.10 (m, 0.5H), 4.58 (m, 1H), 4.73 (m, 1H), 4.89 (m, 0.5H), 4.97 (m, 0.5H), 5.30 (m, 0.5H), 5.44 (m, 2H), 5.64 (m, 1H), 7.1-7.0 (m, 3H), 7.47 (m, 4H), 8.08-7.98 (m, 3H).

Hydrolysis of the methyl esters **11c** and **11d** (24 mg, 0.033 mmol) was carried out in THF/MeOH/H_2O (1 mL / 0.5 mL / 0.5 mL) with LiOH.$2H_2O$ (11 mg,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

243
238

0.246 mmol) over a period of 16 h at RT. After that period the reaction mixture was acidified to pH 4-5 and chromatographed on a C18 reversed phase HPLC column using a solvent gradient from H_2O (0.06% TFA) to 50% aqueous CH_3CN (0.06% TFA). The desired compounds **214** and **218** were isolated from the mixture of the two compounds in high purity (94% pure by HPLC) in 15% yield (3 mg).

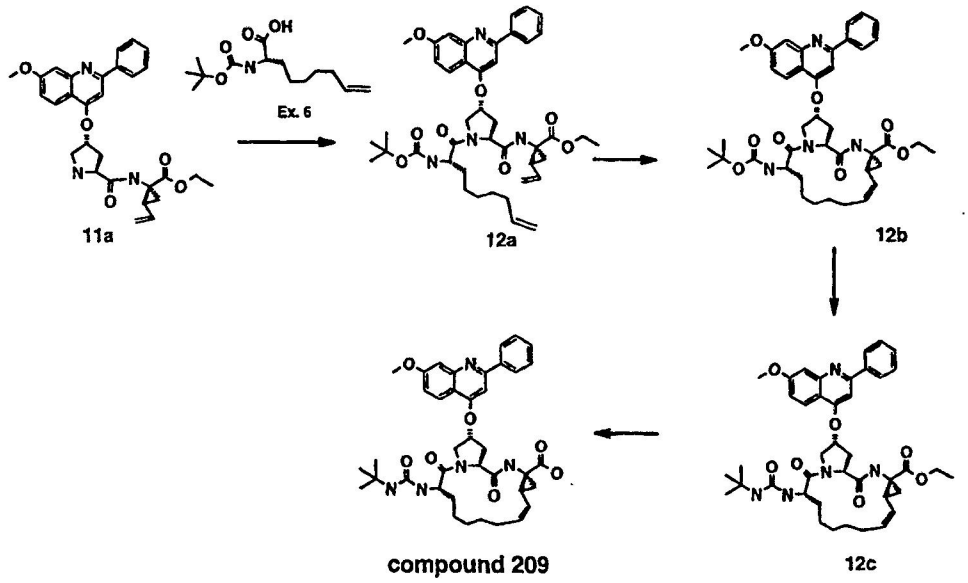
214: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 1.15 (s, 9H), 1.48-1.54 (m, 2H), 1.65-1.74 (m, 1H), 1.77-1.85 (m, 1H), 2.12-2.25 (m, 4H), 2.27-2.34 (m, 1H), 2.61-2.68 (m, 1H), 2.87 (bt, J = 11.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 9.2 & 1.5 Hz, 1H, Pro-δ), 3.97 (s, 3H, $-OCH_3$), 4.14-4.20 (m, 1H), 4.52 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Pro-α), 4.66 (d, J = 11.8 Hz, 1H, Pro-δ), 5.45 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 5.51-5.58 (m, 1H), 5.82 (bs, 1H, Pro-γ), 7.09 (d, J = 6.0 Hz, 1H, BocNH), 7.26 (bs, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.67 (bs, 3H), 8.16 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.83 (s, 1H, ACCA-NH).

218: ^{1}H NMR(DMSO, 400 MHz): δ 1.06-1.10 (m, 1H), 1.18 (s, 9H), 1.52-1.55 (m, 1H), 1.62-1.80 (m, 1H), 2.10-2.68 (overlapping, 9H), 3.90 (bd, J = 8.3 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 4.20-4.27 (m, 1H), 4.58-4.63 (m, 1H, Pro-δ), 4.66 (dd, J = 8.3 Hz, 1H, Pro-α) 4.88 (dd, J = 10.2 Hz, 1H), 5.18-5.26 (m, 1H), 5.73-5.79 (m, 1H, Pro-γ), 7.01 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.23 (bs, 1H), 7.50 (bs, 1H), 7.66 (bs, 3H), 8.20 (bs, 2H), 8.53 (s, 1H).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

EXAMPLE 12

Synthesis of compound 209 (Table 2)



The P1-P2 fragment **11a** (208 mg, 0.415 mmol) and linker **6** (as in Example 6 but n=6) (113 mg, 0.415 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) were allowed to react over a period of 16 h at RT in the presence of HATU (189 mg, 0.498 mmol) and DIPEA (252 µL, 1.45 mmol). The CH_2Cl_2 was evaporated, the residue taken into EtOAc (50 mL) and the organic solution washed with 5% $NaHCO_3$ (2 x 20 mL), brine (2 x 20 mL), dried and evaporated. The crude compound obtained was chromatographed on silica gel using as the eluent a gradient of hexanes/EtOAc (7:3 to 1:1) to give compound **12a** in 79% isolated yield (249 mg).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.22 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.30-1.50 (m, 7H), 1.41 (s, 9H), 1.56-1.64 (m, 1H), 1.72-1.81 (m, 1H), 1.85-1.91 (m, 1H), 1.98- 2.05 (m, 2H), 2.15 (dd, J = 8.5 & 17.4 Hz, 1H), 2.36-2.45 (m, 1H), 2.93-3.02 (m, 1H), 3.91-3.95 (m, 1H), 3.96 (s, 3H, -OCH3), 4.07-4.20 (m, 2H), 4.30 (bd, J = 10.5 Hz, 1H), 4.41-4.48 (m, 1H), 4.82-4.87 (m, 1H), 4.88-5.00 (m, 2H), 5.07-5.15 (m, 2H), 5.27-5.34 (m, 1H), 5.44 (bs, 1H), 5.70-5.80 (m, 2H), 7.05-7.13 (m, 2H), 7.43-7.58 (m, 5H), 8.00-8.09 (m, 3H).

ES(+)MS: m/z 255.3 $(M+H)^+$.

The diene **12a** (249 mg, 0.330 mmol) was dissolved in 30 mL of anhydrous CH_2Cl_2 and the solution was degassed with argon for 15 min. The catalyst bis-(tricyclohexylphosphine) benzylidene ruthenium IV dichloride (82 mg, 0.100 mmol) was dissolved in 3 mL of anhydrous and degassed CH_2Cl_2 and added to the diene solution. The reaction mixture was refluxed for 2 h under N_2. The solution was concentrated and purified by flash column chromatography to obtain compound **12b** as a brown solid in 71% yield (171 mg).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.22-1.44 (m, 10H), 1.42 (s, 9H), 1.66-1.74 (m, 1H), 1.87-1.97 (m, 2H), 2.13-2.28 (m, 3H), 2.32-2.39 (m, 1H), 3.08-3.16 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 4.07-4.22 (m, 3H), 4.28-4.34 (m, 1H), 4.58-4.64 (m, 1H), 4.95-4.99 (m, 1H), 5.22-5.29 (m, 2H), 5.38-5.43 (m, 1H), 5.48-5.56 (m, 1H), 7.00-7.12 (m, 3H), 7.43-7.55 (m, 4H), 7.97-8.11 (m, 3H).

ES(+)MS: m/z 727.4 $(M+H)^+$.

Compound **12b** (0.117 mmol) was stirred in a solution of HCl (1 mL of 4N in dioxane) for 30 min and concentrated to dryness. The solid was taken up in CH_2Cl_2 (2 mL), Et_3N (82 µL, 0.585 mmol) and t-butylisocyanate (35 mg, 0.351 mmol) were successively added. After stirring at RT for 20 h, the mixture was concentrated to dryness and the crude compound **12c** was used in the final hydrolysis step without further purification.

Compound **12c** (85 mg, 0.117 mmol) was dissolved in THF/MeOH/H_2O (2 mL /1 mL/ 1 mL), LiOH.H_2O (39 mg, 0.936 mmol) was added and the solution was stirred for 20 h at RT. After that period, acetic acid (1 mL) was added and the solution was concentrated to remove the MeOH and THF. The pure compound **209** was isolated after purification of the crude by C18 reverse phase HPLC (25 mg, ~31% yield).

^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1.04 (s, 9H), 1.15-1.24 (m, 2H), 1.30-1.40 (m, 5H), 1.44-1.51 (m, 2H), 1.54-1.68 (m, 1H), 1.75-1.88 (m, 1H), 2.18 (dd, J = 17.2 & 8.5 Hz, 1H), 2.32-2.45 (m, 1H, Pro-β), 2.54-2.62 (m, 1H), 2.65-2.68 (m, 1H, Pro-β), 3.91 (dd, J = 11.1 & 3.5 Hz, 1H, Pro-δ), 3.96 (s, 3H, -OCH_3), 4.17-4.23 (m, 1H), 4.47 (dd, J = 8.6, 1H, Pro-α), 4.67 (bd, J = 7.9 Hz, 1H, Pro-δ), 5.30 (dd, J = 9.5 Hz, 1H), 5.52 (bdd, J = 19 & 8.3, 1H), 5.68 (s, 1H), 5.78 (bs, 1H, Pro-γ), 5.94 (bs, 1H), 7.21 (bs, 1H), 7.51 (bs, 1H), 7.66 (bs, 4H), 8.19 (s, 2H), 8.40 (d, J = 7 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H, ACCA-NH).

ES(+)MS: m/z 698.3 $(M+H)^+$.

EXAMPLE 13

Full-length NS3-NS4A heterodimer protein assay

The NS2-NS5B-3'non coding region was cloned by RT-PCR into the pCR®3 vector (Invitrogen) using RNA extracted from the serum of an HCV genotype 1b infected individual (provided by Dr. Bernard Willems, Hôpital St-Luc, Montréal, Québec, Canada). The NS3-NS4A region (NS3-NS4AFL) was then subcloned by PCR into the pFastBac™ HTa baculovirus expression vector (Gibco/BRL). The vector sequence includes a region encoding a 28-residue N-terminal sequence which contains a hexahistidine tag. The Bac-to-Bac™ baculovirus expression system (Gibco/BRL) was used to produce the recombinant baculovirus. His-NS3-NS4AFL was expressed by infecting 10^6 Sf21 cells/mL with the recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of 0.1-0.2 at 27°. Authentic auto-proteolysis occurs during expression to produce a non covalent and stable NS3-NS4A protein complex (referred to as full-length "FL"). The infected culture was harvested 48 to 64 h later by centrifugation at 4°. The cell pellet was homogenized in 50mM $NaPO_4$, pH 7.5, 40% glycerol (w/v), 2mM β-mercaptoethanol, in presence of a cocktail of protease inhibitors. His-NS3-NS4AFL was then extracted from the cell lysate with 1.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 0.5M NaCl, and a DNase treatment.

After ultracentrifugation, the soluble extract was diluted 4-fold and bound on a Pharmacia Hi-Trap Ni-chelating column. The His-NS3-NS4AFL was eluted in a >90% pure form (as judged by SDS-PAGE), using a 50 to 400 mM imidazole gradient. The His-NS3-NS4AFL was stored at -80° in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 10% (w/v) glycerol, 0.5 M NaCl, 0.25 M imidazole, 0.1% NP-40. It was thawed on ice and diluted just prior to use.

The protease activity of His-NS3-NS4AFL was assayed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25 M sodium citrate, 0.01% (w/v) n-dodecyl-β-D-maltoside, 1 mM TCEP. Five (5) μM of the internally quenched substrate anthranilyl-DDIVPAbu[C(O)-O]-AMY(3-NO_2)TW-OH in presence of various concentrations of inhibitor were incubated with 1.5 nM of His-NS3-NS4AFL for 45 min at 23°. The final DMSO concentration did not exceed 5.25%. The reaction was terminated with the addition of 1M MES, pH 5.8. Fluorescence of the N-terminal product was monitored on a Perkin-Elmer LS-50B fluorometer equipped with a 96-well plate reader (excitation wavelength: 325 nm; emission wavelength: 423 nm).

The % inhibition was calculated with the following equation:

$$100 - [(counts_{inh}-counts_{blank})/(counts_{ctl}-counts_{blank})\times 100]$$

A non-linear curve fit with the Hill model was applied to the inhibition-concentration data, and the 50% effective concentration (IC_{50}) was calculated by the use of SAS software (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

EXAMPLE 14

Specificity assays

The specificity of the compounds was determined against a variety of serine proteases: human leukocyte elastase, porcine pancreatic elastase and bovine pancreatic α-chymotrypsin and one cysteine protease: human liver cathepsin

B. In all cases a 96-well plate format protocol using a chromogenic substrate specific for each enzyme was used. Each assay included a 1 h enzyme-inhibitor pre-incubation at RT followed by addition of substrate and hydrolysis to ≈30% conversion as measured on a UV Thermomax® microplate reader or a fluorescence Perkin-Elmer® L550B plate reader. Substrate concentrations were kept as low as possible compared to K_M to reduce substrate competition. Compound concentrations varied from 300 to 0.06 μM depending on their potency.

The final conditions for each assay were as follows:

- 50mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M Na_2SO_4, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 3% DMSO, 0.01% Tween-20 with;
- [100 μM Succ-AAPF-pNA and 250 pM α-chymotrypsin], [133 μM Succ-AAA-pNA and 8 nM porcine elastase], [133 μM Succ-AAV-pNA and 8 nM leukocyte elastase]; or
- [100 mM $NaHPO_4$ pH 6, 1 mM EDTA, 3% DMSO, 1mM TCEP, 0.01% Tween-20, 4 μM Z-FR-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) and 0.5 nM cathepsin B (the stock enzyme was activated in buffer containing 20 mM TCEP before use)].

A representative example is summarized below for porcine pancreatic elastase:

In a polystyrene flat-bottom 96-well plate (Cellwells, Corning) were added using a Biomek liquid handler (Beckman):

- 40 μL of assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M Na_2SO_4, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA);
- 20 μL of enzyme solution (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.02% Tween-20, 40 nM porcine pancreatic elastase); and
- 20 μL of inhibitor solution (50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.02% Tween-20, 1.5 mM-0.3 μM inhibitor, 15% v/v DMSO).

After 60 min pre-incubation at RT, 20 µL of substrate solution (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M Na_2SO_4, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 665 µM Succ-AAA-pNA) were added to each well and the reaction was further incubated at RT for 60 min after which time the absorbance was read on the UV Thermomax® plate reader. Rows of wells were allocated for controls (no inhibitor) and for blanks (no inhibitor and no enzyme).

The sequential 2-fold dilutions of the inhibitor solution were performed on a separate plate by the liquid handler using 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.02% Tween-20, 15% DMSO. All other specificity assays were performed in a similar fashion.

The percentage of inhibition was calculated using the formula:

$$[1-((UV_{inh}-UV_{blank})/(UV_{ctl}-UV_{blank}))] \times 100$$

A non-linear curve fit with the Hill model was applied to the inhibition-concentration data, and the 50% effective concentration (IC_{50}) was calculated by the use of SAS software (Statistical Software System; SAS Institute, Inc., Cary, N.C.).

EXAMPLE 15

NS3 Protease Cell-based assay

This assay is done with Huh-7 cells, a human cell line derived from a hepatoma, co-transfected with 2 DNA constructs:

- one expressing a polyprotein comprising the HCV non-structural proteins fused to tTA in the following order: NS3-NS4A-NS4B-NS5A-tTA (called NS3);
- the other expressing the reporter protein, secreted alkaline phosphatase

under the control of tTA (called SEAP).

The polyprotein must be cleaved by the NS3 protease for the mature proteins to be released. Upon release of the mature proteins, it is believed that the viral proteins will form a complex at the membrane of the endoplasmic reticulum while tTA will migrate to the nucleus and transactivate the SEAP gene. Therefore, reduction of NS3 proteolytic activity should lead to reduction of mature tTA levels and concomitant decrease in SEAP activity. To control for toxicity of the compound, a parallel transfection is done where a construct expressing tTA alone (called tTA) is co-transfected with the SEAP construct such that SEAP activity is independent of NS3 proteolytic activity.

Protocol of the assay: Huh-7 cells, grown in CHO-SFMII + 10% FCS (fetal calf serum), were co-transfected with NS3 and SEAP using the FuGene protocol (Boehringer Mannheim). After 5 h at 37°, the cells were washed, trypsinized and plated (at 80 000 cells/well) in 96-well plates containing a range of concentrations of the compounds to be tested. After a 24-h incubation period, the SEAP activity in the medium was measured with the Phospha-Light kit (Tropix).

Analysis of the percent inhibition of SEAP activity with respect to compound concentration was performed with the SAS software to obtain the EC_{50}.

EXAMPLE 16

Tables of compounds

The following tables list compounds representative of the invention.

All compounds listed in Tables 1 to 4 were found to be active in the assay presented in Example 13 with an IC_{50} under 50μM.

~~251~~ 246

Compound 202 was found not to inhibit the specificity assays presented in Example 14 The results from the different specificity assays are the following: HLE >300μM; PPE >300μM; α-Chym. >300 μM; Cat. B >300 μM; indicating that these compounds are specific toward the HCV NS3 protease and will cause minimal side-effects when injected in infected mammals.

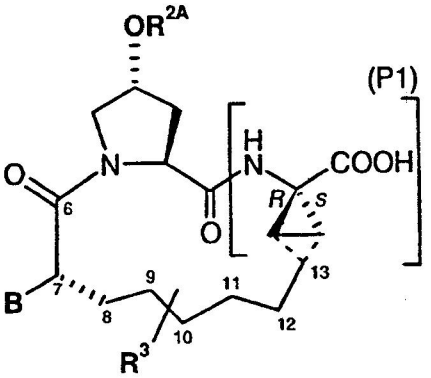
These results indicate that this family of compounds is highly specific for the NS3 protease.

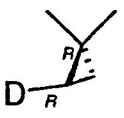
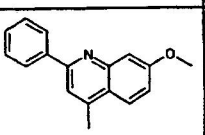
In addition, certain of these compounds were tested in the cell-based assay described in Example 15 and were found to have activity with an EC_{50} below 1μM, strongly indicating that these compounds can cross the cell membrane, are bioavailable and are effective *in vivo*.

The following abbreviations are used within the present disclosure: MS: Mass spectrometric data; Ac: acetyl; ACCA: 1-amino-cyclopropylcarboxylic acid; Bn: benzyl; Boc: *tert*-butyloxycarbonyl; Ph: phenyl; *t*Bu: *tert*-butyl.

~~252~~ 247

TABLE 1

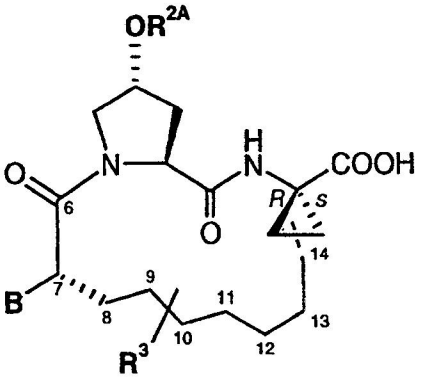


Cpd. #	B	R^3	double bond	P1	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
101	N-Boc	–	12,13-trans			685.8

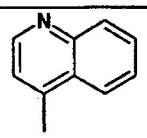
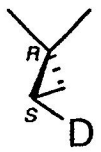
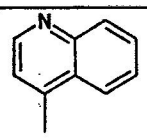
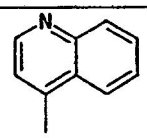
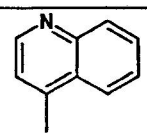
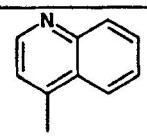
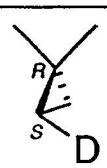
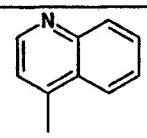
US20040142895A1

253
248

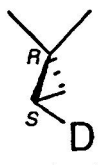
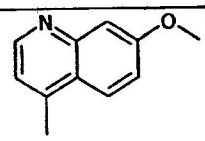
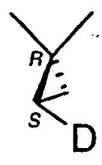
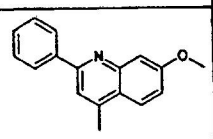
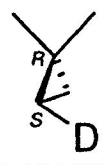
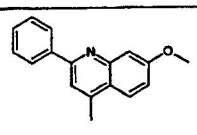
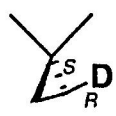
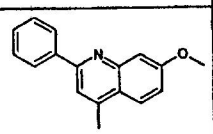
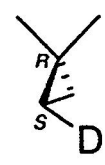
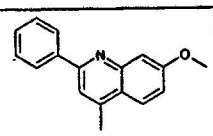
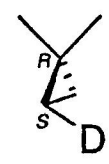
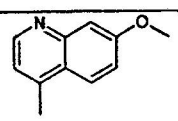
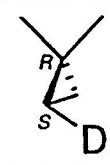
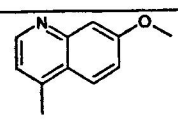
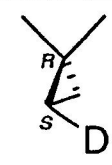
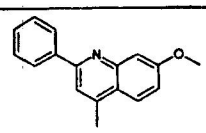
TABLE 2

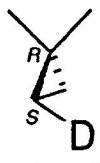
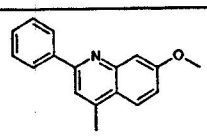
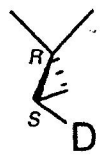
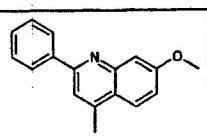
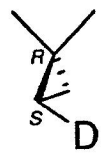
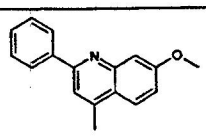
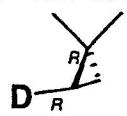
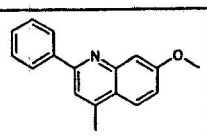


single stereoisomer at the cyclopropane

Cpd #	B	R^3	double bond	P1 stereochemistry	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
201	N-Boc	–	10,11-*trans*	?		593.7
202	N-Boc	–	10,11-*trans*			593.7
203	N-acetyl		10,11-*trans*			535.6
204	N-Boc	10-OH, 11-OH *syn* (one isomer)	–	?		627.7
205	N-Boc	10-OH, 11-OH *syn* (other isomer)	–	?		627.7
206	N-Boc	–	11,12-*cis*			593.7

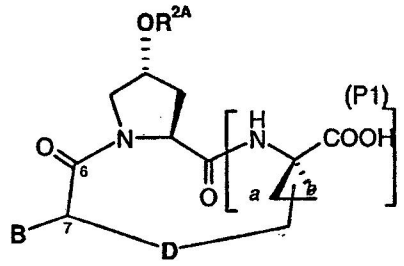
~~254~~
249

Cpd #	B	R'	double bond	P1 stereochemistry	R^{2A}	MS *m/z*= $(M+H)^+$
207	N-Boc	--	12,13-*cis*			623.7
208	N-Boc	--	12,13-*cis*			699.8
209	NC(O)-NtBu	--	12,13-*cis*			698.8
210	N-Boc	--	12,13-*cis*			699.8
211	NH_2	--	13,14-*cis*			599.7
212	OH one isomer	--	13,14-*cis*			524.6
213	OH other isomer	--	13,14-*cis*			524.6
214	N-Boc	10-oxo	13,14-*cis*			713.8

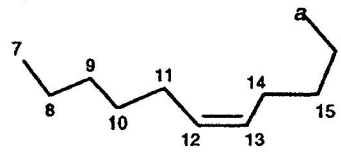
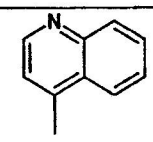
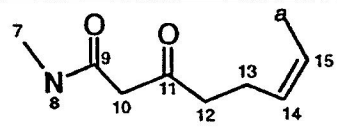
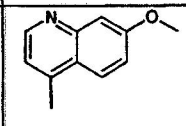
Cpd #	B	R³	double bond	P1 stereochemistry	R^{2A}	MS *m/z*= $(M+H)^+$
215	N-Boc	–	none			701.8
216	N-Boc	10-OH	13,14-*cis*			715.8
217	N-Boc	10-OH	13,14-*cis*			715.8
218	N-Boc	10-oxo	13,14-*cis*			713.8

~~256~~
251

TABLE 3

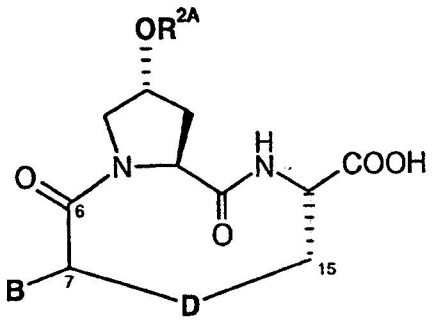


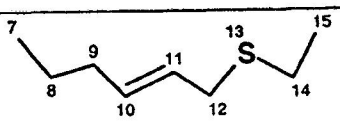
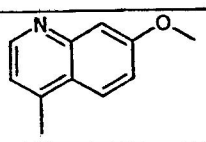
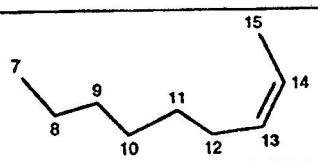
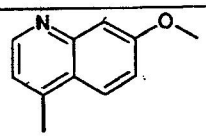
single stereoisomer at the cyclopropane

Cpd. #	B	- D -	P1	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
301	N-Boc		a or b syn to acid		621.7
302			a or b syn to acid		581.6

0040004-0040099

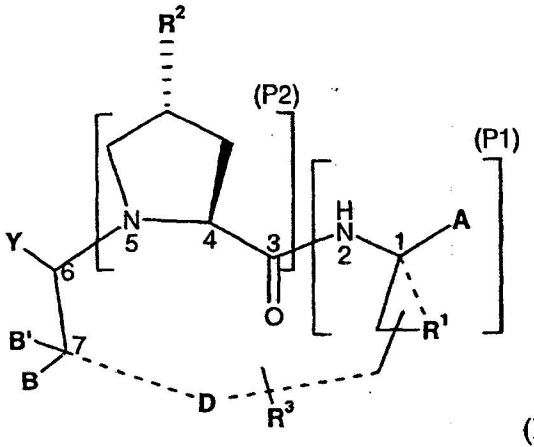
TABLE 4



Cpd. #	B	- D -	R^{2A}	MS *m/z*= $(M+H)^+$
401	Boc			629.7
402	Boc			611.7

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound of formula (I):



(I)

wherein:

R^1 is H, CHO, CH_2OH, thiol; or a C_{1-3} alkylene optionally linked to the carbon atom number 1 to form a "spiro"-cyclic system; and

R^2 is R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} or $NR^{2A}R^{2B}$ wherein R^{2A} and R^{2B} are independently:

C_{1-16} alkyl, C_{2-16} alkenyl, saturated or unsaturated C_{3-16} cycloalkyl, said alkyl, alkenyl or cycloalkyl being optionally substituted with NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalkyl, or carboxyl; said alkyl, alkenyl or cycloalkyl optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N; or R^{2A} and R^{2B} are independently selected from a first C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl, said first aryl or aralkyl optionally substituted with C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalkyl, C_{1-6} alkoxy, carboxyl, lower(alkyl) carboxylic acid, or a second aryl or aralkyl; said first and second aryl or aralkyl optionally containing at

least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N;
said saturated or unsaturated cycloalkyl, aryl or aralkyl being optionally fused with a second 5-, 6-, or 7-membered ring to form a cyclic system or heterocycle, said second ring being optionally substituted with NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalkyl, carboxyl or lower(alkyl) carboxylic acid; said second ring optionally containing at least one heteroatom selected independently from the group consisting of: O, S, and N;

Y is H, carbonyl, thiocarbonyl, C_{1-6} alkyl, C_{3-10} cycloalkyl, C_{1-6} alkoxy, $C_{6 \text{ or } 10}$ aryl or C_{7-16} aralkyl;

B is H, hydroxyl, amino, amide, carbonyl, thiol, alkyl, aryl, or B is a heteroatom- containing saturated or unsaturated alkyl chain linked to D to form a heterocycle;

B' is H, OH, NH_2, SH, or a substituted amino.

D is a C_{5-10} saturated or unsaturated alkylene chain optionally containing one to three heteroatoms independently selected from: O, S or N;

R^3 is H or from one to five substituents independently selected from hydroxyl, halo, amino, amide, carbonyl, thiol, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, C_6 or C_{10} aryl or C_{7-16} aralkyl ;
and
A is a carboxylic acid or a N-substituted amide;
or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.

261

255

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODO AQUEL A QUIEN CONCIERNA LO PRESENTE

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

7 de Febrero de 2000

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE ADJUNTA A LA MISMA HAY UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA EN LO QUE SIGUE, QUE CUMPLEN LOS REQUISITOS PARA OTORGARLE UNA FECHA DE PRESENTACIÓN BAJO 35 USC 111.

NÚMERO DE SOLICITUD: *60/128.011*
FECHA DE PRESENTACIÓN: *6 de Abril de 1999*

Por la Autoridad del
COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS

T. LAWRENCE

Oficial certificador

~~262~~
256

HOJA PORTADA DE SOLICITUD PROVISIONAL

Esta es una petición para presentar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo 37 CFR 1.53 (b)(2)

N° de expediente 13/076PV		Escribir a maquina un signo más (+) dentro de esta casilla	+

INVENTOR(ES)/SOLICITANTE(S)			
APELLIDO	NOMBRE	INICIAL CENTRAL	RESIDENCIA (CIUDAD Y ESTADO O PAÍS EXTRANJERO)
TSANTRIZOS	YOULA	S.	Saint-Laurent, Quebec (Canadá)

TÍTULO DE LA INVENCIÓN (máximo 280 caracteres)

PÉPTIDOS MACROCÍCLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C

DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

Dr. R.P. Raymond
Boehringer Ingelheim Corp.
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368
Ridgefield

ESTADO	Connecticut	COD. POSTAL	06877	PAÍS	EE.UU.

PARTES DE LA SOLICITUD ANEJAS *(márquese todo lo que sea pertinente)*

☒ Memoria descriptiva	Número de páginas	77	☐ Declaración de pequeña entidad	
☐ Dibujos	Número de hojas		☐ Otros (especificar)	

MÉTODO DE PAGO *(marcar uno)*

☐ Se adjunta un cheque o giro postal para cubrir la tasa de presentación provisional		CANTIDAD DE LA TASA DE PRESENTACIÓN PROVISIONAL ($)	$150.00
☒ El Comisionado está autorizado con la presente para cargar las tasas de presentación y abonar el N° de cuenta de depósito Se adjunta una copia duplicada de este documento para conveniencia del Comisionado Adjunto	02-2955		

La invención se efectuó mediante una Agencia del Gobierno de los Estados Unidos o bajo un Contrato con una Agencia del Gobierno de los Estados Unidos.

☒ No.
☐ Sí, el nombre de la Agencia del Gobierno de EE.UU. y el número de contrato con el Gobierno son:_____

Respetuosamente sometido,

FIRMA: Ilegible **Fecha:** 6 Abril 1999

NOMBRE ESCRITO A MÁQUINA
o IMPRESO: Anthony Bottino

N° de registro: 41.629
(si procede)

☐ Los inventores adicionales son nombrados en hojas numeradas por separado anejas al presente.

PRESENTACIÓN DE SOLICITUD PROVISIONAL ÚNICAMENTE

Declaración de gravamen por horas: Se estima que este Formulario tarda 2 horas en completarse. El tiempo variará en función de las necesidades del caso particular. Cualquier comentario sobre la cantidad de tiempo que requiera Vd. para completar este Formulario deberá enviarse a la Oficina de División de Asistencia de Calidad y Mejora, Oficina de Patentes y Marcas Registradas, Washington, DC 20231 y a la Oficina de Información y Asuntos Reguladores, Oficina de Gestión y Presupuestos (Proyecto 0651-00XX), Washington, DC 20503. NO ENVIAR TASAS NI FORMULARIOS COMPLETADOS A ESTA DIRECCIÓN. Enviarlos al Jefe de Patentes y Marcas Registradas, Washington, DC 20231.

PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos, a composiciones, a la preparación de tales compuestos y a métodos para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV). En particular, la presente invención proporciona nuevos análogos de péptidos, composiciones farmacéuticas que contienen tales análogos, y métodos para usar estos análogos en el tratamiento de una infección por HCV.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

El virus de la hepatitis C (HCV) es el principal agente etiológico de la hepatitis no-A no-B, de adquisición post-transfusional y comunitaria. Se estima que más de 100 millones de personas están infectadas por el virus en todo el mundo. Un elevado porcentaje de portadores llegan a estar infectados crónicamente y muchos prosiguen hasta una enfermedad hepática crónica, la llamada hepatitis C crónica. Este grupo es a su vez de alto riesgo para enfermedades hepáticas graves tales como cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular y enfermedades hepáticas terminales que llevan a la muerte.

El mecanismo por el cual el HCV establece persistencia viral y produce una elevada tasa de enfermedades hepáticas crónicas no ha sido aún dilucidado del todo. No se sabe cómo interacciona el HCV con el sistema inmunitario del hospedador y lo evade. Además, quedan aún por establecer los papeles de las respuestas inmunes celulares y humorales en la protección frente a la infección por HCV y la enfermedad. Se han publicado inmunoglobulinas para la profilaxis de la hepatitis viral asociada a transfusiones, pero el Centro para el Control de Enfermedades no recomienda actualmente el tratamiento con inmunoglobulinas con esta finalidad. La falta de una respuesta inmune protectora eficaz está estorbando el desarrollo

de una vacuna o de adecuadas medidas profilácticas post-exposición, por lo que a corto plazo las esperanzas están firmemente articuladas en intervenciones antivirales.

Se han llevado a cabo diversos estudios clínicos con el objeto de identificar agentes farmacéuticos capaces de tratar eficazmente la infección por HCV en pacientes afectados de hepatitis C crónica. Estos estudios han implicado el uso de interferón-alfa, solo o en combinación con otros agentes antivirales. Tales estudios han indicado que un número sustancial de los participantes no responden a estas terapias, y, entre los que sí responden favorablemente, se encontró que una gran proporción recaía después de la terminación del tratamiento.

Hasta hace poco, el interferón (IFN) era la única terapia disponible de provecho confirmado, aprobada clínicamente para pacientes con hepatitis C crónica. Sin embargo, la tasa de respuesta mantenida es baja y el tratamiento con interferón induce también graves efectos secundarios (p. ej. retinopatía, tiroiditis, pancreatitis aguda, depresión) que reducen la calidad de vida de los pacientes tratados. El interferón en combinación con ribavirina ha sido aprobado recientemente para pacientes que no responden al IFN solo. Sin embargo, los efectos secundarios provocados por el IFN no se ven aliviados con esta terapia de combinación.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar agentes antivirales eficaces para el tratamiento de la infección por HCV que superen las limitaciones de las terapias farmacéuticas existentes.

El HCV es un virus de RNA de cadena positiva envuelto, de la familia de los Flaviviridae. El genoma de RNA del HCV de cadena simple tiene una longitud de aproximadamente 9500 nucleótidos y tiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una única y gran poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. En las células infectadas, esta poliproteína es segmentada en múltiples sitios por proteasas celulares y virales para producir las proteínas estructurales y no es-

~~265~~
259

tructurales (NS). En el caso del HCV, la generación de proteínas no estructurales maduras (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) es realizada por dos proteasas virales. La primera, hasta ahora escasamente caracterizada, segmenta en el empalme NS2-NS3; la segunda es una proteasa de serina contenida dentro de la región N-terminal de NS3 (denominada por ello proteasa NS3) y media todas las segmentaciones subsiguientes corriente abajo de NS3, tanto en *cis*, en el sitio de segmentación NS3-NS4A, como en *trans*, para los sitios restantes NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. La proteína NS4A parece servir para múltiples funciones, actuando como cofactor para la proteasa NS3 y posiblemente asistiendo en la localización de la membrana de NS3 y otros componentes de la replicasa viral. La formación del complejo de la proteína NS3 con NS4A parece necesaria para los eventos de procesamiento, mejorando la eficiencia proteolítica en la totalidad de los sitios. La proteína NS3 muestra también actividades de nucleósido trifosfatasa y RNA helicasa. La NS5B es una RNA polimerasa dependiente del RNA que está implicada en la replicación del HCV.

La solicitud de patente WO 97/06804 describe el enantiómero (-) del análogo de nucleósido citosina-1,3-oxatiolano (también conocido como 3TC) como activo frente a HCV. Este compuesto, aunque calificado como seguro en ensayos clínicos previos frente al HIV y al HBV, ha de ser aún clínicamente probado como activo contra el HCV y su mecanismo de acción contra el virus no ha sido aún publicado.

Una estrategia general para el desarrollo de agentes antivirales es desactivar enzimas codificadas viralmente que son esenciales para la replicación del virus.

En esta disposición, los intensos esfuerzos para descubrir compuestos que inhiben la NS3 proteasa o la RNA helicasa del HCV han llevado a las siguientes descripciones:

- La patente de EE.UU. nº 5.633.388 describe carboxamidas sustituidas con heterociclos y análogos como activas frente al HCV. Estos compuestos están dirigidos contra

la actividad de helicasa de la proteína NS3 del virus, pero aún no se han publicado pruebas clínicas.

- Chu et al. (Tet. Lett. (1996), 7229-7232) han publicado que una fenantrenoquinona tiene actividad contra la NS3 proteasa de HCV *in vitro*. No se ha publicado ningún desarrollo posterior acerca de este compuesto.
- Un trabajo publicado en la Novena Conferencia Internacional sobre Investigación Antiviral, Urabandai, Fukyshima, Japón (1996) (Antiviral Research (1996) 30, 1, A23 (resumen 19)) informa acerca de derivados de tiazolidina que son inhibidores de la proteasa del HCV.

Varios estudios han informado acerca de compuestos inhibidores para otras proteasas de serina, tales como la elastasa leucocitaria humana. Una familia de estos compuestos se publica en el documento WO 95/33764 (Hoechst Marion Roussel, 1995). Los péptidos descritos en esa solicitud son análogos del morfolinilcarbonil-benzoil-péptido que son estructuralmente diferentes de los péptidos de la presente invención.

- El documento WO 98/17679 de Vertex Pharmaceuticals Inc. describe inhibidores de proteasa de serina, en particular la NS3 proteasa del virus de la hepatitis C.
- Hoffman La Roche ha publicado también hexapéptidos que son inhibidores de proteinasa útiles como agentes antivirales para el tratamiento de la infección por HCV.
- Steinkühler et al. e Ingallinella et al. han publicado acerca de la inhibición de producto NS4A-4B (Biochemistry (1998) 37, 8899-8905 y 8906-8914).

Ninguna de las anteriores solicitudes de patente descritas antes describe o sugiere péptidos cíclicos activos contra el virus de la hepatitis C y selectivos para esa proteasa contra otras proteasas de serina.

Los documentos WO 99/07733 y WO 99/07734 describen de hexa- a tetra-péptidos y análogos que inhiben la NS3 proteasa. Sin embargo, estas descripciones no sugieren ni llevan al diseño de análogos macrocíclicos de la presente invención.

Una ventaja de la presente invención es que proporciona

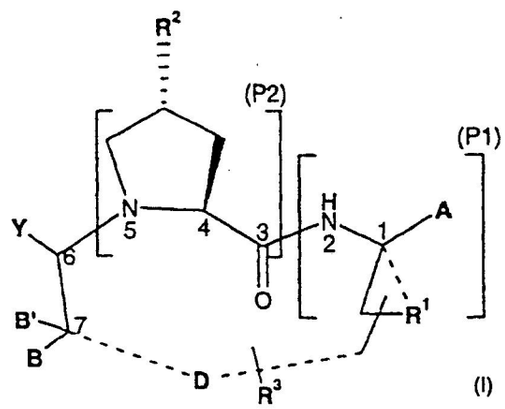
dipéptidos macrocíclicos que son inhibidores para la NS3 proteasa del virus de la hepatitis C.

Una ventaja adicional de un aspecto de la invención reside en el hecho de que estos péptidos inhiben específicamente la NS3 proteasa y no muestran una actividad inhibidora significativa a concentraciones de hasta 300 μM contra otras proteasas de serina tales como la eslastasa leucocitaria humana (HLE), elastasa pancreática porcina (PPE), o quimiotripsina pancreática bovina, o proteasas de cisteína tales como la catepsina B hepática humana (Cat B).

Una ventaja adicional de la presente invención es que proporciona péptidos pequeños de bajo peso molecular que son capaces de atravesar las membranas de las células y son activos en cultivos de células e in vivo con un buen perfil farmacocinético.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se incluyen en el alcance de la invención compuestos de fórmula (I):



(I)

en la que

R^1 es H, CHO, CH_2OH, tiol; o un alquileno C_{1-3}, opcionalmente enlazado al átomo de carbono número 1 para formar un sistema "espiro"-cíclico; y

R^2 es R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} o $NR^{2A}R^{2B}$, en donde R^{2A} y R^{2B} son,

independientemente:

alquilo C_{1-16}, alquenilo C_{2-16}, cicloalquilo C_{3-16} saturado o insaturado, estando dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido con NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalquilo o carboxilo; conteniendo dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N; o R^{2A} y R^{2B} se seleccionan independientemente de un primer arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}, estando dicho primer arilo o aralquilo opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-7}, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalquilo, alcoxi C_{1-6}, carboxilo, ácido (alquil)inferior-carboxílico o un segundo arilo o aralquilo; conteniendo dicho primero y segundo arilo o aralquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

estando dicho cicloalquilo, arilo o aralquilo, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un segundo anillo de 5, 6 ó 7 miembros para formar un sistema cíclico o heterociclo, estando dicho segundo anillo opcionalmente sustituido con NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalquilo, carboxilo o ácido (alquil)inferior-carboxílico; conteniendo dicho segundo anillo, opcionalmente, al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

Y es H, carbonilo, tiocarbonilo, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, alcoxi C_{1-6}, arilo $C_{6\ 6\ 10}$ o aralquilo C_{7-16};

B es H, hidroxilo, amino, amida, carbonilo, tiol, alquilo, arilo, o **B** es una cadena de alquilo que contiene un heteroátomo, saturada o insaturada, enlazada a **D** para formar un heterociclo;

B' es H, OH, NH_2, SH o un amino sustituido.

D es una cadena de alquileno C_{5-10}, saturada o insaturada, que contiene opcionalmente uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de: O, S o N;

R^3 es H o de uno a cinco sustituyentes independientemente seleccionados de hidroxilo, halo, amino, amida, carbonilo, tiol, alquilo C_{1-6}, alcoxi C_{1-6}, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}; y

A es un ácido carboxílico o una amida N-sustituida;

o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.

Se incluye dentro del alcance de esta invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz como anti-virus de la hepatitis C de un compuesto de fórmula I, o una sal o éster del mismo aceptables terapéuticamente, mezclado con un medio vehículo o un agente auxiliar aceptables farmacéuticamente.

Un aspecto importante de la invención implica un método para tratar una infección viral de hepatitis C en un mamífero administrando al mamífero una cantidad eficaz como anti-virus de la hepatitis C del compuesto de fórmula **I**, o una sal o éster del mismo aceptables terapéuticamente, o una composición como se describió antes.

Otro aspecto importante implica un método para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C exponiendo el virus a una cantidad capaz de inhibir la NS3 proteasa de la hepatitis C, del compuesto de fórmula **I**, o una sal o éster del mismo aceptables terapéuticamente, o una composición como se describió antes.

Todavía otro aspecto implica un método para tratar una infección viral de hepatitis C en un mamífero administrándole una cantidad eficaz como anti-virus de la hepatitis C de una combinación del compuesto de fórmula **I**, o una sal o éster del mismo aceptables terapéuticamente. De acuerdo con una realización, las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden un agente inmunomodulador adicional. Ejemplos de agentes inmunomoduladores adicionales incluyen, pero no se limitan a α-, β- y δ-interferones.

DESCRIPCION DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS

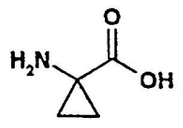
~~270~~
264

Definiciones

Como se usa en el presente texto, las definiciones que siguen son válidas a menos que se indique otra cosa:

Con referencia a los casos en los que se usan *(R)* o *(S)* para designar la configuración absoluta de un sustituyente, p. ej. R^1 del compuesto de fórmula **I**, la designación se hace en el contexto del compuesto y no en el contexto del sustituyente solo.

Como se usa en el presente texto, la expresión "ácido 1-aminociclopropil-carboxílico" (ACCA) se refiere a un compuesto de fórmula:

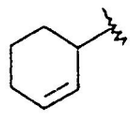


El término "halo", como se usa en el presente texto, significa un sustituyente de halógeno elegido entre bromo, cloro, flúor o yodo.

El término "alquilo C_1-C_6" o "alquilo (inferior)", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa sustituyentes de alquilo acíclico, de cadena lineal o ramificada, que contienen de 1 a seis átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, 1-metiletilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo.

El término "cicloalquilo C_{3-10}", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un sustituyente de cicloalquilo que contiene de tres a siete átomos de carbono, e incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

La expresión "cicloalquilo insaturado" incluye, por ejemplo, el sustituyente ciclohexenilo:



El término "alquenilo C_{6-10}", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un sustituyente de alquilo según se definió antes, que contiene de 6 a 10 átomos de carbono y que contiene, además, al menos un doble enlace.

La expresión "alquileno saturado o insaturado", como se usa en el presente texto, significa un sustituyente de alquilo divalente derivado de la separación de un átomo de hidrógeno de cada extremo de un hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, e incluye, por ejemplo,

$-CH_2CH_2C(CH_3)_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH=CHCH_2CH_2-$ o $-CH_2C\equiv CCH_2CH_2-$.

El término "alcoxi C_{1-6}", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa el sustituyente -O-alquilo C_{1-6}, en donde alquilo es como se definió antes, que contiene hasta seis átomos de carbono. Alcoxi incluye metoxi, etoxi, propoxi, 1-metiletoxi, butoxi y 1,1-dimetiletoxi. Este último sustituyente es conocido comúnmente como terc-butoxi.

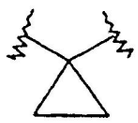
El término "arilo C_6 o C_{10}", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un sistema monocíclico aromático que contiene 6 átomos de carbono o un sistema bicíclico aromático que contiene 10 átomos de carbono. Por ejemplo, arilo incluye un sistema de anillo de fenilo o de naftilo.

El término "aralquilo C_{7-16}", como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un arilo como se definió anteriormente unido a través de un grupo alquilo, en donde el alquilo es como se definió anteriormente que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Aralquilo incluye, por ejemplo, bencilo y butilfenilo.

La expresión "ácido alquil(inferior)-carboxílico", como

se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un grupo ácido carboxílico (COOH) enlazado a través de un grupo alquilo (inferior) como se definió anteriormente, e incluye, por ejemplo, ácido butírico.

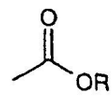
La expresión grupo "espiro"-cíclico representa, por ejemplo, espiro-ciclopropilo, también representado como:



La expresión "heterociclo" o "anillo heterocíclico", como se usa en el presente texto, bien sea sola o en combinación con otro sustituyente, significa un sustituyente monovalente derivado por separación de un hidrógeno de un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado, que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos de heterociclos adecuados incluyen: pirrolidina, tetrahidrofurano, tiazolidina, pirrol, tiofeno, diazepina, 1H-imidazol, 1-metil-1H-imidazol, isoxazol, tiazol, 2-metiltiazol, 2-aminotiazol, piperidina, 1,4-dioxano, 4-morfolina, piridina, 2-metilpiridina, pirimidina, 4-metilpirimidina y 2,4-dimetilpirimidina. Esta expresión incluye también un heterociclo según se define antes, condensado con uno o más de otros ciclos, ya sea un heterociclo o cualquier otro ciclo. Ejemplos de sistemas heterocíclicos adecuados incluyen: tiazolo[4,5-b]-piridina, quinolina o indol.

La expresión "éster aceptable farmacéuticamente", como se usa en el presente texto, bien sea sola o en combinación con otro sustituyente, significa ésteres del compuesto de fórmula I en los que cualquiera de las funciones carboxilo de la molécula, pero preferentemente el extremo carboxi, está reemplazado por una función alcoxicarbonilo:

~~275~~
267



en la que el resto **R** del éster se elige entre alquilo (p. ej. metilo, etilo, n-propilo, t-butilo, n-butilo); alcoxialquilo (p. ej. metoximetilo); alcoxiacilo (p. ej. acetoximetilo); aralquilo (p. ej. bencilo); ariloxialquilo (p. ej. fenoximetilo); arilo (p. ej. fenilo), opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-4}. Otros ésteres profármacos adecuados se pueden encontrar en Design of prodrugs, Bundgaard, H. Ed. Elsevier (1985), que se incorpora al presente texto como referencia. Tales ésteres aceptables farmacéuticamente se hidrolizan normalmente *in vivo* cuando son inyectados en un mamífero, y se transforman en la forma ácido del compuesto de fórmula **I**.

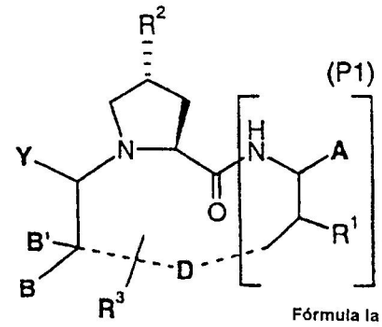
Con relación a los ésteres descritos anteriormente, a menos que se especifique otra cosa, cualquier resto alquilo presente contendrá ventajosamente de 1 a 16 átomos de carbono, en particular de 1 a 6 átomos de carbono. Cualquier resto arilo presente en tales ésteres comprende ventajosamente un grupo fenilo.

En particular, los ésteres pueden ser un éster de alquilo C_{1-16}, un éster de bencilo no sustituido o un éster de bencilo sustituido con al menos un halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi C_{1-6}, nitro o trifluorometilo.

La expresión "sal aceptable farmacéuticamente", como se usa en el presente texto, incluye las sales derivadas de bases aceptables farmacéuticamente. Ejemplos de bases adecuadas incluyen colina, etanolamina y etilendiamina. Las sales de Na^+, K^+ y Ca^{++} se consideran también dentro del alcance de la invención (véase también Pharmaceutical salts, Birge, S.M. et al., J. Pharm. Sci. (1977), 66, 1-19, incorporada al presente texto como referencia).

Realizaciones preferidas

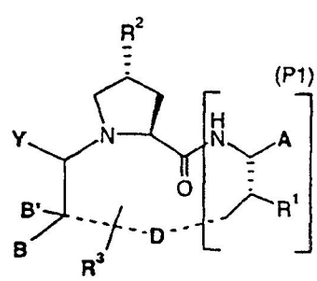
Compuestos de fórmula I se pueden representar, preferiblemente, por la fórmula **Ia**:



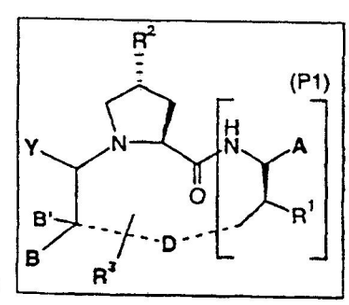
Fórmula Ia

en donde R^1 es preferiblemente H, CHO, CH_2OH o CH_2SH, OH o SH. Más preferiblemente, R^1 es H, o CHO. Lo más preferiblemente, R^1 es H.

Más preferiblemente, compuestos de fórmula **Ia** están presentes en forma de enantiómeros sencillos representados por la fórmula **IIa** o **IIb**:



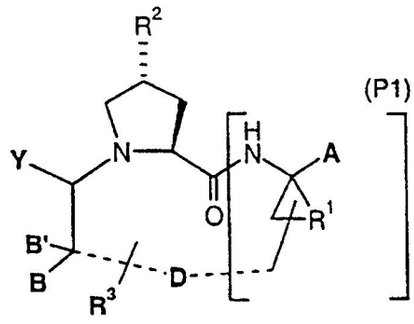
(IIa); o



(IIb).

Lo más preferiblemente, compuestos de fórmula **Ia** están presentes en forma de enantiómeros sencillos de la fórmula **IIb**.

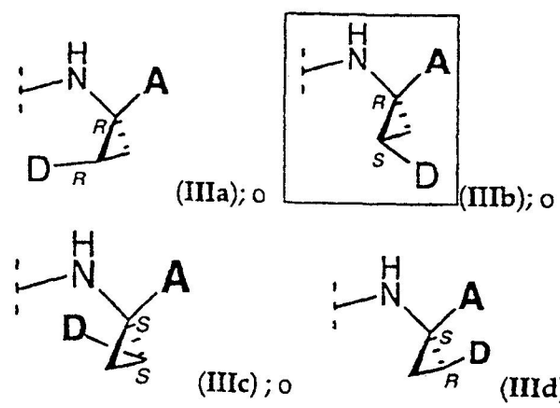
Alternativamente, R^1 es preferiblemente un alquileno C_{1-3} enlazado al átomo de carbono número 1 para formar un sistema "espiro"-cíclico, de modo que compuestos de la fórmula **I** se pueden representar por la fórmula **Ib**:



Fórmula Ib.

Más preferiblemente, R^1 es una cadena de alquileno C_1 o C_2 que forma un sustituyente espirociclopropilo o espirociclobutilo. Lo más preferiblemente, R^1 es $-CH_2-$ y forma un espirociclopropilo.

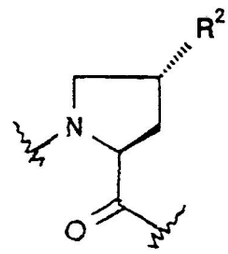
Cuando se prefieren compuestos de fórmula **Ib**, estos pueden existir en 4 diastereoisómeros diferentes representados por las conformaciones **IIIa**, **IIIb**, **IIIc** o **IIId**.



Se prefieren más compuestos de fórmula **Ib** cuando **D** está unido al átomo de carbono R del anillo de ciclopropilo, según se representa por las fórmulas **IIIa** (1R,2R) y **IIIb** (1R,2S). Lo más preferiblemente, **D** está preferiblemente unido en posición syn al ácido carboxílico **A** (S,R), según se representa por la fórmula **IIIb**.

Preferiblemente, R^2 es un sustituyente en la posición, 3, 4 ó 5 del anillo de prolina. Más preferiblemente, R^2 está sustituido en la posición 4 ó 5. Lo más preferiblemente, R^2 está sustituido en la posición 4 de prolina con la estereo-

química mostrada más abajo:



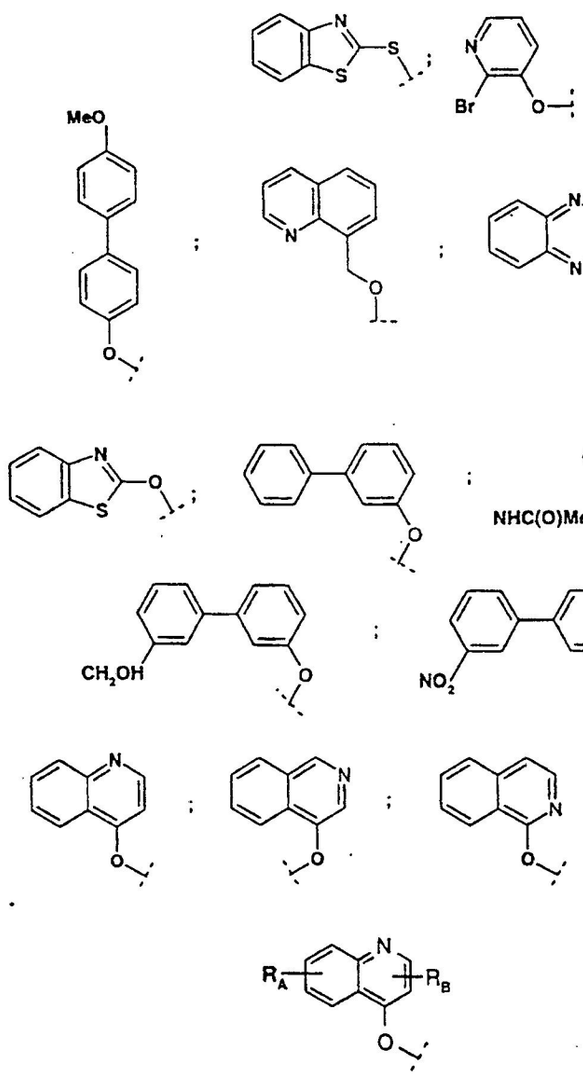
en donde R^2 es preferiblemente R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} o $NR^{2A}R^{2B}$, en donde R^{2A} y R^{2B} son, independientemente:

alquilo C_{1-16}, alquenilo C_{2-16}, cicloalquilo C_{3-16} saturado o insaturado, estando dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido con NH_2, OH, halo, haloalquilo o carboxilo; conteniendo dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O y N; o

R^{2A} y R^{2B} se seleccionan independientemente de un primer arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}, estando dicho primer arilo o aralquilo opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-7}, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, halo, haloalquilo, alcoxi C_{1-6}, carboxilo, ácido (alquil)inferior-carboxílico o un fenilo; conteniendo dicho primer arilo o aralquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O y N;

estando dicho cicloalquilo, arilo o aralquilo, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un segundo anillo de 5, 6 ó 7 miembros para formar un sistema cíclico o heterociclo, estando dicho anillo de 5, 6 ó 7 miembros opcionalmente sustituido con NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, halo, haloalquilo; conteniendo dicho anillo de 5, 6 ó 7 miembros, opcionalmente, al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O y N.

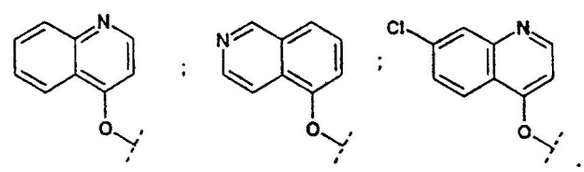
Más preferiblemente, R^2 es Bn; $PhCH_2CH_2$; $PhCH_2CH_2CH_2$; O-Bn; o-tolilmetoxi; m-tolilmetoxi; p-tolilmetoxi; 1-naftiloxi; 2-naftiloxi; 1-naftilmetoxi; 2-naftilmetoxi; (4-terc-butil)metoxi; (3I-Ph)CH_2O; (4Br-Ph)O; (2Br-Ph)O; (3Br-Ph)O; (4I-Ph)O; (3Br-Ph)CH_2O; (3,5-Br_2-Ph)CH_2O;

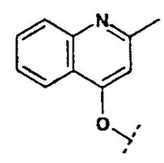
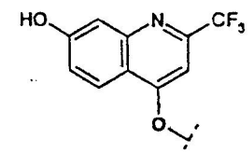
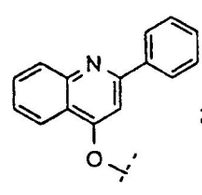
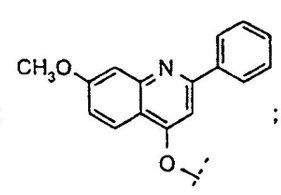
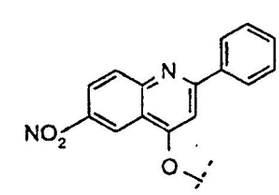
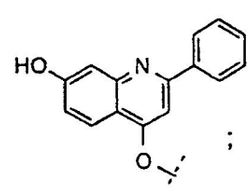
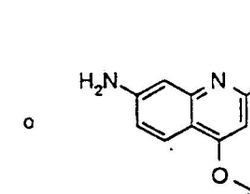


en donde R_A es OH, alquilo, alcoxi, halo, haloalquilo, nitro, amino o amida; y R_B es alquilo, haloalquilo o arilo.

Lo más preferiblemente, R^2 es OR^{2A}, en donde R^{2A} es un arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}, opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6}, NH_2, $NHC(O)CH_3$; NO_2, OH, halo, carboxilo o ácido (alquil)inferior-carboxílico o un fenilo; conteniendo dicho arilo o aralquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O y N.

Todavía lo más preferiblemente, R^2 es:



Preferiblemente, **Y** es carbonilo, tiocarbonilo, alcoxi, arilo o aralquilo. Más preferiblemente, **Y** es carbonilo, alcoxi, arilo o aralquilo. Lo más preferiblemente, **Y** es carbonilo.

Preferiblemente, **B** es H, amino, amido, carboxi, carbamato, urea, o un arilo, o **B** es una cadena de alquilo que contiene nitrógeno, saturada o insaturada, enlazada a **D** para formar un heterociclo opcionalmente sustituido con R^4, en

donde R^4 es un alquilo, alquenilo, alcoxi o arilo, conteniendo todos opcionalmente un heteroátomo; estando dicho heterociclo también opcionalmente condensado con un cicloalquilo o arilo para formar un sistema bicíclico. Por ejemplo, **B** puede ser un anillo de pirrol o indol.

Más preferiblemente, **B** es H, amino, una amida de la fórmula N-C(O)R^5, un acilo de la fórmula -C(O)-R^5, un carbamato de la fórmula N-C(O)-OR^5, una urea de la fórmula N-C(O)-N-R^5 o un arilo opcionalmente sustituido con R^5, en donde R^5 es alquilo inferior, arilo o un heterociclo saturado o insaturado.

Lo más preferiblemente, **B** es terc-butoxicarbonilo o acetilo.

Preferiblemente, **B'** es H, OH, NH_2, SH o un amino sustituido. Más preferiblemente, **B'** es OH, NH_2, SH o un amino sustituido. Lo más preferiblemente, **B'** es OH, cuando **B** es un arilo.

Preferiblemente, **D** es una cadena de alquileno, alquenileno o alquinileno de C_6 a C_9, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos seleccionados de: O, S o N, estando dicha cadena opcionalmente mono- a penta-sustituida con R^3. Más preferiblemente, **D** es una cadena de alquileno o alquenileno de C_6 a C_8, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos seleccionados de: O o S, estando dicha cadena opcionalmente mono- a tri-sustituida con R^3. Lo más preferiblemente, **D** es una cadena de alquileno o alquenileno de C_7 o C_8, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos seleccionados de: O o S, estando dicha cadena opcionalmente mono- o di-sustituida con R^3.

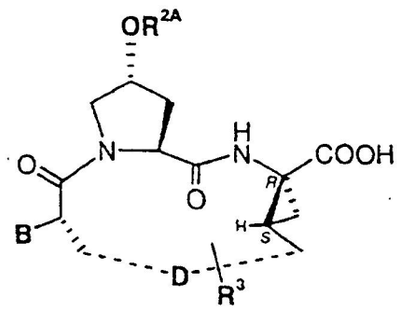
Preferiblemente, R^3 es hidroxi, tio, amino, halo, carbonilo, alquilo, alcoxi o arilo. Más preferiblemente, R^3 es hidroxi, tio, amino, halo o carbonilo. Lo más preferiblemente, R^3 es hidroxi, tio, halo o carbonilo.

Preferiblemente, **A** es un ácido carboxílico o C(O)N(R^{6A})R^{6B}, en donde R^{6A} y R^{6B} son, independientemente, H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con hidroxi, tio, amino,

halo, alcoxi, arilo, aralquilo, cicloalquilo o un heterociclo.

Más preferiblemente, **A** es C(O)OH, C(O)NH-arilo o C(O)NH-aralquilo. Lo más preferiblemente, **A** es C(O)OH, C(O)NH-bencilo o C(O)NH-CH(CH_3)-fenilo.

Incluso lo más preferiblemente, compuestos de la invención se representan por la fórmula **III**:



Fórmula III

en donde:

R^{2A} se selecciona de un primer arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}, estando dicho primer arilo o aralquilo opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-7}, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalquilo, alcoxi C_{1-6}, carboxilo, ácido (alquil)inferior-carboxílico o un segundo arilo o aralquilo; conteniendo dichos primer y segundo arilos o aralquilos opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

estando dicho cicloalquilo, arilo o aralquilo, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un segundo anillo de 5, 6 ó 7 miembros para formar un sistema cíclico o heterociclo, estando dicho segundo anillo opcionalmente sustituido con NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalquilo, carboxilo o ácido (alquil)inferior-carboxílico; conteniendo dicho segundo anillo, opcionalmente, al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

B es H o un carbamato de la fórmula N-C(O)-OR^5, en donde R^5

es alquilo inferior;

D es una cadena de alquileno, alquenileno o alquinileno C_{5-10}, que contiene opcionalmente uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de: O, S o N;

R^3 es uno, dos o tres sustituyentes independientemente seleccionados de hidroxilo, halo, amino, amida, carbonilo, tiol, alquilo C_{1-6}, alcoxi C_{1-6}, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}; o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, están incluidos en el alcance de esta invención todos los compuestos de fórmula I que se presentan en las Tablas 1 a 4.

De acuerdo con una realización alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden comprender adicionalmente un agente antivírico. Ejemplos de agentes antivíricos incluyen ribavirina y amantadina.

De acuerdo con otra realización alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden comprender adicionalmente otros inhibidores de la proteasa de HCV.

De acuerdo todavía con otra realización alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden comprender adicionalmente un inhibidor de otras dianas en el ciclo vital de HCV, tal como helicasa, polimerasa o metaloproteasa.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas oralmente, parenteralmente o mediante un reservorio implantado. Nosotros preferimos la administración oral o la administración mediante inyección. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualesquiera soportes, coadyuvantes o vehículos convencionales, no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos, bases o tampones aceptables farmacéuticamente para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de suministro. El término parenteral, como se usa en el presente texto, incluye las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intrasternal, intratecal e intralesional.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un preparado inyectable estéril, por ejemplo como suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse oralmente en cualquier forma de dosificación aceptable oralmente incluyendo, pero sin limitarse a ellas, cápsulas, comprimidos y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los soportes que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran oralmente suspensiones acuosas, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

Otros vehículos o soportes adecuados para las formulaciones y composiciones anteriormente indicadas pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, p. ej. en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1995.

Niveles de dosificación entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día, de los compuestos inhibidores de proteasa descritos en el presente texto, son útiles en una monoterapia para la prevención y el tratamiento de enfermedades mediadas por el HCV. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención serán administradas entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 veces al día o, alternativamente, como una infusión continua. Tal administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los ma-

teriales de soporte para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración en particular. Un preparado típico contendrá de aproximadamente 5% a aproximadamente 95% de compuesto activo (p/p). Preferentemente, tales preparados contienen de aproximadamente 20% a aproximadamente 80% de compuesto activo.

Como apreciará el profesional experto, pueden requerirse dosis más bajas o más altas que las citadas antes. La dosificación específica y los regímenes de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la infección, la disposición del paciente hacia la infección y el criterio del médico responsable del caso. En general, el tratamiento se inicia con pequeñas dosis sustancialmente menores que la dosis del péptido óptima. A continuación, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias dadas. En general, lo más deseable es administrar el compuesto a un nivel de concentración que generalmente proporcionará resultados eficaces antiviralmente sin provocar ningún efecto secundario nocivo ni perjudicial.

Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto de fórmula I y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deberían estar presentes en niveles de dosificación entre aproximadamente 10 y 100%, y más preferentemente entre aproximadamente 10 y 80% de la dosificación normalmente administrada en un regimen de monoterapia.

Cuando estos compuestos o sus sales aceptables farmacéuticamente se formulan junto con un soporte aceptable farmacéuticamente, la composición resultante puede ser administra-

da *in vivo* a mamíferos, tales como el hombre, para inhibir la NS3 proteasa del HCV o para tratar o prevenir la infección por el virus HCV. Tal tratamiento puede también conseguirse usando los compuestos de esta invención en combinación con agentes que incluyen, pero no se limitan a: agentes inmunomoduladores tales como α-, β- o γ-interferones; otros agentes antivirales tales como ribavirina, amantadina; otros inhibidores de la NS3 proteasa del HCV; inhibidores de otras dianas del ciclo vital del HCV tales como helicasa, polimerasa, metaloproteasa o sitio de entrada al ribosoma interno (IRES); o combinaciones de los mismos. Los agentes adicionales pueden combinarse con los compuestos de esta invención para crear una forma de dosificación individual. Alternativamente, estos agentes adicionales pueden ser administrados separadamente a un mamífero como parte de una forma de dosificación múltiple.

En consecuencia, otra realización de esta invención proporciona métodos para inhibir la actividad de la NS3 proteasa del HCV en mamíferos administrando un compuesto de la fórmula I, en la que los sustituyentes son como se definió anteriormente.

En una realización preferida, estos métodos son útiles para reducir la actividad de la NS3 proteasa del HCV en un mamífero. Si la composición farmacéutica comprende solamente un compuesto de esta invención como el componente activo, tales métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de administrar a dicho mamífero un agente elegido entre un agente inmunomodulador, un agente antiviral, un inhibidor de la proteasa del HCV, o un inhibidor de otras dianas en el ciclo vital del HCV tales como la helicasa, polimerasa o metaloproteasa. Tal agente adicional puede ser administrado al mamífero antes de, o al mismo tiempo que la administración de las composiciones de esta invención.

En una realización preferida alternativa, estos métodos son útiles para inhibir la replicación viral en un mamífero. Tales métodos son útiles para tratar o prevenir enfermedades por el HCV. Si la composición farmacéutica comprende solamen-

te un compuesto de esta invención como componente activo, tales métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de administrar a dicho mamífero un agente elegido entre un agente inmunomodulador, un agente antiviral, un inhibidor de la proteasa del HCV, o un inhibidor de otras dianas en el ciclo vital del HCV. Tal agente adicional puede ser administrado al mamífero antes, al mismo tiempo, o después de la administración de la composición de acuerdo con esta invención.

Los compuestos expuestos en el presente texto pueden ser usados también como reactivos de laboratorio. Los compuestos de esta invención pueden usarse también para tratar o prevenir la contaminación viral de materiales y, por tanto, para reducir el riesgo de infección viral del personal de laboratorio o médico, o de pacientes que entran en contacto con tales materiales (p. ej. sangre, tejidos, instrumentos e indumentaria quirúrgica, instrumentos e indumentaria de laboratorio, y aparatos y materiales para obtención de sangre o para transfusiones).

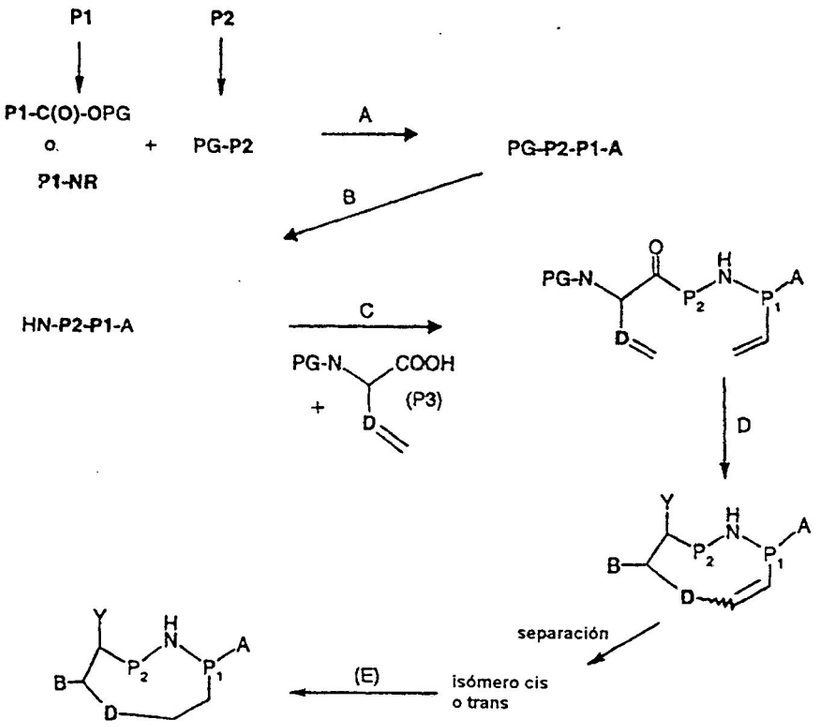
Metodología

PROCEDIMIENTO

Los compuestos de la presente invención (en donde **Y** no es H y **B** no es H) se sintetizaron de acuerdo con un procedimiento general tal como se ilustra en el Esquema I (en donde PG son grupos protectores de carboxi específicos, tal como se reconocerá por las personas expertas en la técnica).

Cuando la invención cubre compuestos de fórmula I en la que **A** es una amida N-sustituida, P1 está acoplado a una amina apropiada antes del acoplamiento con P2. Tal aminación será fácilmente reconocida por personas expertas en la técnica. Como reconocerán las personas expertas en la técnica, tal amina no está protegida, sino que lleva cualquier sustituyente relevante (R).

Esquema I



A, B, C) Brevemente, los P1, P2 y P3 pueden ser enlazados por técnicas de acoplamiento de péptidos bien conocidas. Generalmente, los péptidos se alargan desprotegiendo el grupo α-amino del resto N-terminal y acoplando el grupo carboxilo no protegido del siguiente aminoácido adecuadamente N-protegido a través de un enlace péptido utilizando los métodos descritos o mediante síntesis de péptidos en fase sólida de acuerdo con el método originalmente descrito en Merrifield, J. Am. Chem. Soc., (1963), 85, 2149-2154, cuya descripción se incorpora con ello como referencia.

Los grupos funcionales de los aminoácidos constituyentes deben generalmente protegerse durante las reacciones de acoplamiento para evitar la formación de productos secundarios indeseables. La mayoría de los grupos protectores que se pueden utilizar están enumerados en Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nueva York (1981) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", vol.

3, Academic Press, Nueva York (1981), cuyas descripciones se incorporan con ello como referencia.

D) La metátesis con cierre del anillo se llevó a cabo utilizando cantidades catalíticas de dicloruro de bis(triciclohexilfosfina)bencilideno-rutenio IV, tal como se describe en la bibliografía: Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 9606-9614.

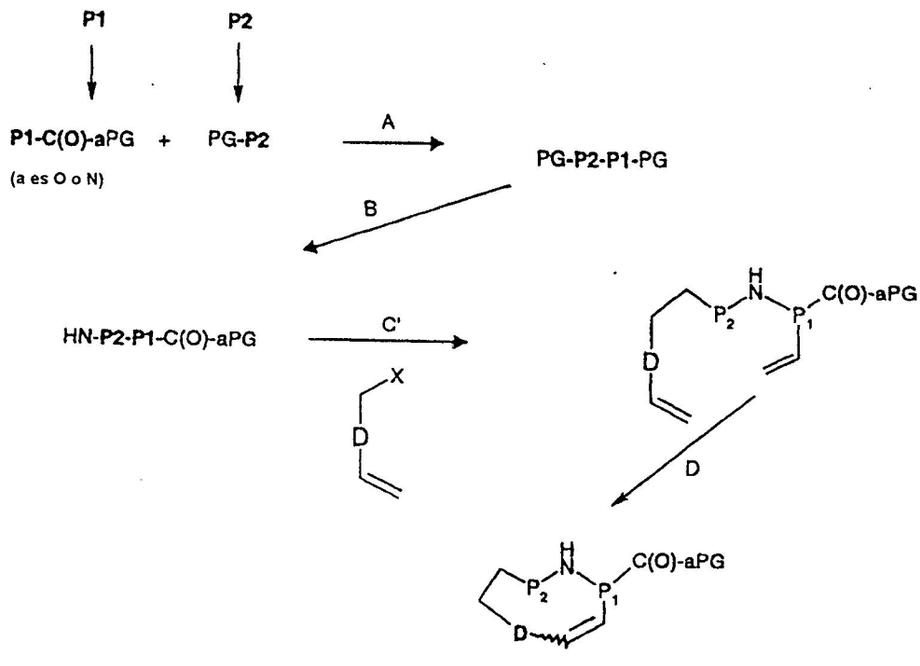
En la mayoría de los casos se formaron predominantemente análogos macrocíclicos con un doble enlace cis. Sin embargo, en los casos en los que se obtuvo una mezcla de los productos cis y trans, los dos compuestos se pudieron separar por HPLC de fase inversa C18 preparativa.

E) Opcionalmente, el doble enlace se puede reducir por métodos de hidrogenación estándar bien conocidos en la técnica.

Una vez que se ha completado el alargamiento del péptido, se separan todos los grupos protectores, los grupos protectores se separan de cualquier manera que viene dictada por la elección de los grupos protectores. Estos procesos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Compuestos de la fórmula **I**, en donde **Y** es H y **B** es H se sintetizan de la siguiente manera:

Esquema Ia



en donde X es Br o I.

C') La adición de D se lleva a cabo mediante alquilación directa del nitrógeno de la prolina P2 con el haluro de alquilo D.

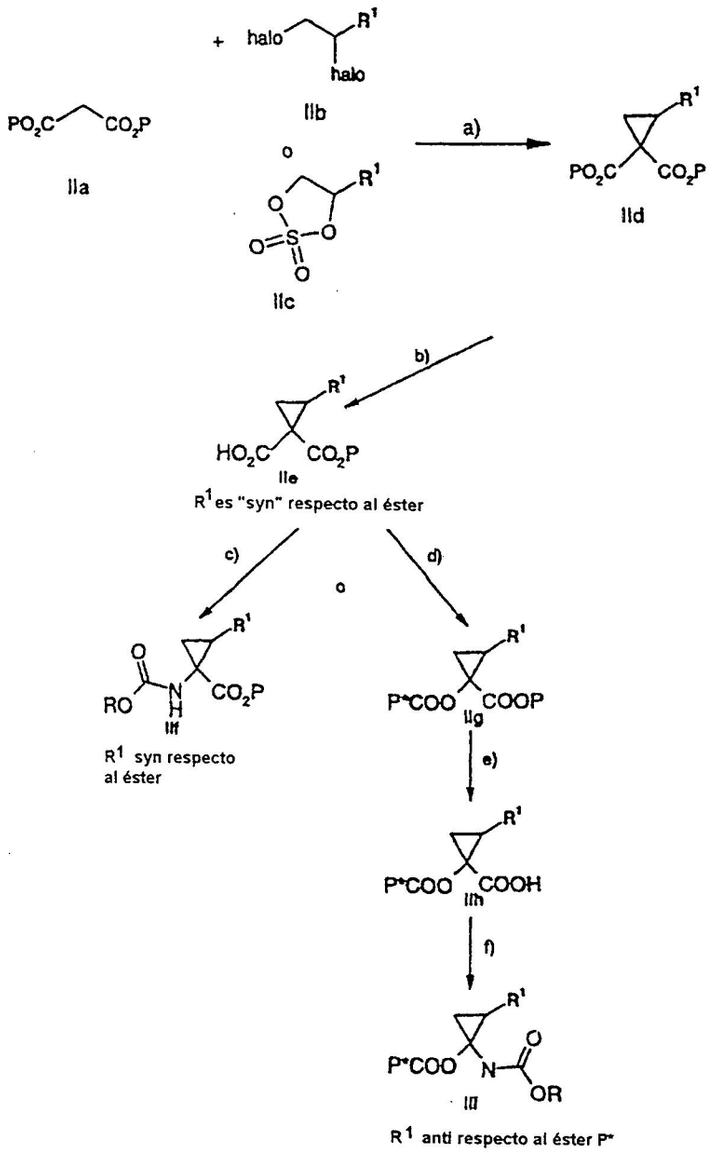
La ciclación e hidrogenación se llevan a cabo como se ha descrito previamente.

Síntesis de restos P1

1. Síntesis de los 4 posibles isómeros de los restos P1 (ácido 1-aminociclopropilcarboxílico 2-sustituido)

La síntesis se realizó de acuerdo con el Esquema II.

Esquema II



a) Brevemente, malonato **IIa** diprotegido y 1,2-dihaloalcano **IIb** o sulfato cíclico **IIc** (sintetizados de acuerdo con K. Burgess y Chun-Yen KE (Synthesis, (1996), 1463-1467) se hacen reaccionar en condiciones básicas para dar el diéster **IId**.

b) Se efectúa una hidrólisis regioselectiva del éster menos estéricamente impedido para dar el ácido **IIe**.

c) Este ácido **IIe** se somete a una reacción de transposición de Curtius para dar una mezcla racémica de derivados del

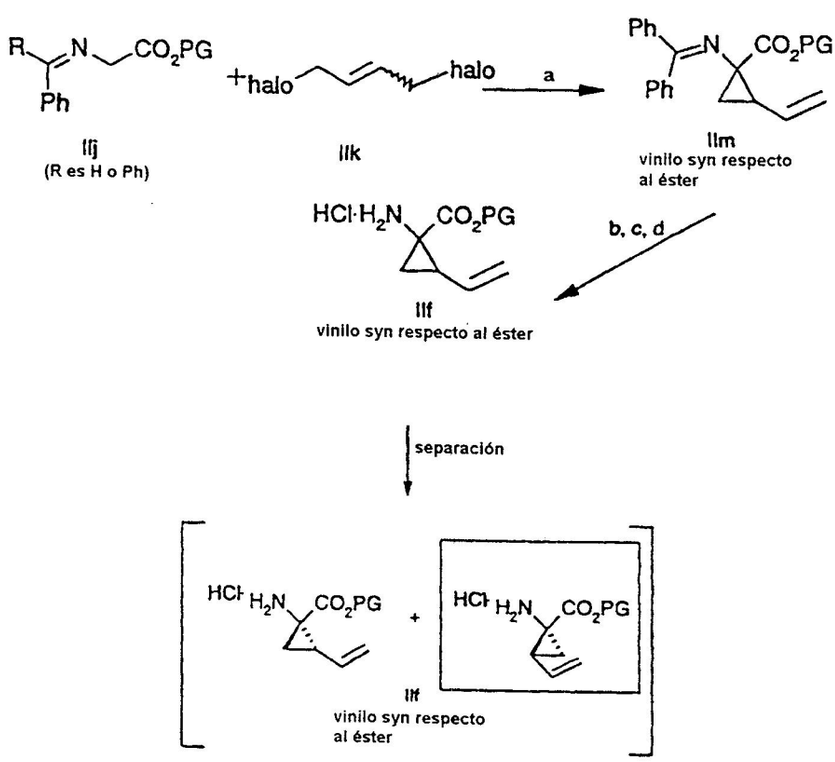
ácido 1-aminociclopropilcarboxílico **IIf**, estando R^1 en posición syn con respecto al grupo carboxilo.

d,e) Alternativamente, la formación selectiva del éster a partir del ácido **IIe** con un haluro (P*Cl) o alcohol (P*OH) apropiado forma el diéster **IIg**, en el que el éster P* es compatible con la hidrólisis selectiva del éster P. La hidrólisis del éster P proporciona el ácido **IIh**.

f) Una reacción de transposición de Curtius en **IIh** da una mezcla racémica de derivados del ácido 1-aminociclopropilcarboxílico **IIi**, estando el grupo R^1 en posición anti con respecto al grupo carboxilo. En el Ejemplo 3 se presenta una realización específica para esta síntesis.

2. A continuación se describe una síntesis alternativa para la preparación de derivados **IIf** (cuando R^1 es vinilo y es syn con respecto al grupo carboxilo).

Esquema IIa



El tratamiento de imina **IIj** comercialmente disponible con 1,4-dihalobuteno **IIk** en presencia de una base produce, después de la hidrólisis de la imina **IIm** resultante, **IIf** que tiene el sustituyente alilo en posición syn con respecto al grupo carboxilo. Este procedimiento se presenta en el Ejemplo 1.

La resolución de todas las mezclas enantiómeras anteriores se puede llevar a cabo vía separación enzimática con Alcalase^{R} según se describe en el Ejemplo 2. Otros medios de resolución y determinación de la estereoquímica absoluta se describen en las solicitudes en tramitación 60/095.931 y 09/219.939 incorporadas en su totalidad en este texto como referencia.

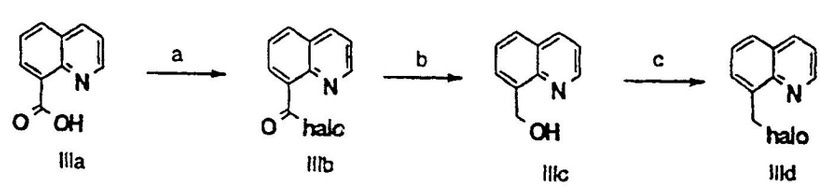
Síntesis de restos P2.

1. Síntesis de precursores:

A) Síntesis de derivados de haloarilmetano.

La preparación de halometil-8-quinolina **IIId** se realizó de acuerdo con el proceso de K.N. Campbell et al., J. Amer. Chem. Soc., (1946), 68, 1844.

Esquema III

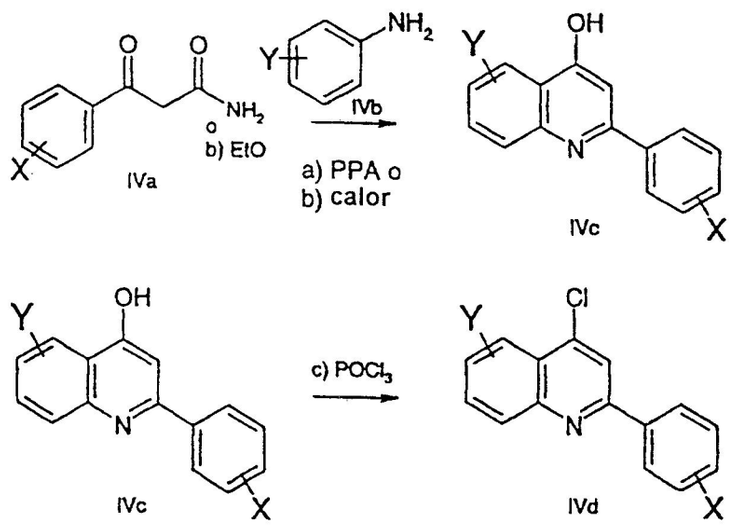


Brevemente, ácido 8-quinolina-carboxílico **IIIa** se convirtió en el correspondiente alcohol **IIIc** mediante reducción del correspondiente haluro de acilo **IIIb** con un agente reductor tal como hidruro de litio y aluminio. El tratamiento del alcohol **IIIb** con el halohidrácido apropiado da los derivados halo **IIId** deseados.

B) Síntesis de derivados de alcoholes arílicos:

Derivados de 2-fenil-4-hidroxiquinolina **IVc** se prepararon de acuerdo con G.A.M. Giardina et al. (J. Med. Chem., (1997), 40, 1794-1807).

Esquema IV



X e Y = arilo, aralquilo, alcoxi, OH, SH, halo, NH_2, NO_2, etc.

a) Benzoilacetamida (**IVa**) se condensó con la anilina (**IVb**) apropiada, y la enamina obtenida se cicló con ácido polifosfórico para dar la correspondiente 2-fenil--4-hidroxiquinolina (**IVc**).

O, alternativamente, el procedimiento se puede llevar a cabo de una manera diferente:

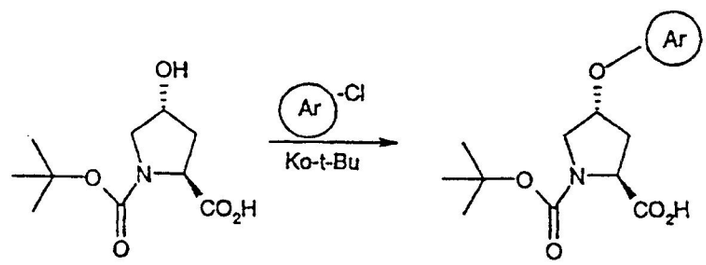
b) Benzoilacetato-éster de etilo (**IVa**) se condensó con la anilina (**IVb**) apropiada en presencia de ácido, y la enamina obtenida se cicló por calentamiento a 260-280° para dar la correspondiente 2-fenil-4-hidroxiquinolina (**IVc**).

c) La hidroxiquinolina (**IVc**) se convirtió en cloroquino-

lina (**IVd**) con $POCl_3$.

La transformación de la cloroquinolina en la prolina sustituida vía alquilación (adición-eliminación) no se describe en la sección B (síntesis de P2). Debe añadirse a B2 (R^{2A} es arilo).

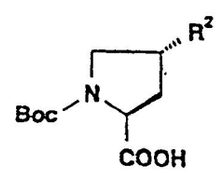
Alternativamente, los compuestos se pueden preparar vía alquilación de BOC-4(S)-hidroxiprolina con una cloroquinolina en presencia de una base tal como terc-butóxido de potasio.



Una realización específica de este procedimiento se presenta en el Ejemplo 5.

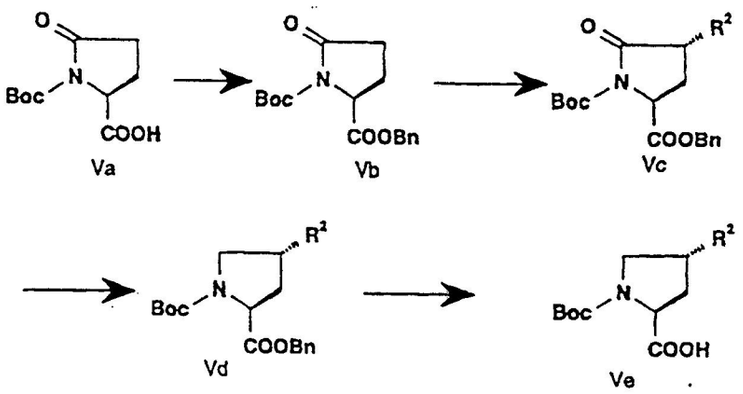
2. Síntesis de P2:

A) La síntesis de prolina 4-sustituida (en donde R^2 está fijado al anillo a través de un átomo de carbono)(con la estereoquímica según se muestra):



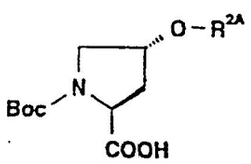
se realiza según se muestra en el Esquema IV de acuerdo con los procesos descritos por J. Ezquerra et al. (Tetrahedron, (1993), 38, 8665-8678) y C. Pedregal et al. (Tetrahedron Lett., (1994), 35, 2053-2056).

Esquema V



Brevemente, ácido Boc-piroglutámico se protege en forma de un éster bencílico. El tratamiento con una base fuerte tal como diisopropilamida de litio, seguido de la adición de un agente alquilante (Br-R^2 o I-R^2) da los compuestos **Ve** deseados después de la reducción de la amida y de la desprotección del éster.

B) La síntesis de 4-(R)-hidroxiprolina O-alquilada:



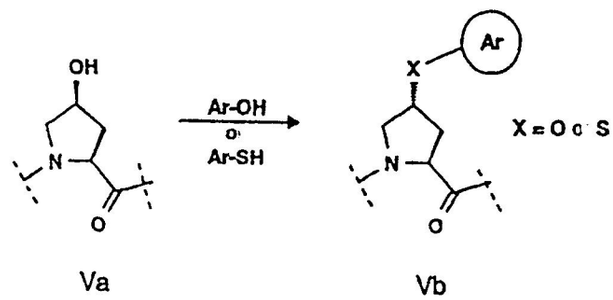
se puede llevar a cabo utilizando los diferentes procedimientos descritos más abajo.

B.1) Cuando R^{2A} es aralquilo, el procedimiento se puede llevar a cabo de acuerdo con el proceso descrito por E.M. Smith et al. (J. Med. Chem. (1988), 31, 875-885). Brevemente, Boc-4(R)-hidroxiprolina comercialmente disponible se trata con una base tal como hidruro de sodio, y el alcóxido resultante se hace reaccionar con un agente alquilante (Br-R^{2A} o I-R^{2A}) para dar los com-

puestos deseados. Realizaciones específicas de este procedimiento se presentan en los Ejemplos 4 y 5.

B.2) Cuando R^{2A} es arilo, los compuestos se pueden preparar a través de una reacción de Mitsunobu (Mitsunobu (1981), Synthesis, 1-28; Rano et al., (1995), Tet. Lett. 36 (22), 3779-3792; Krchnak et al., (1995), Tet. Lett. 36 (5), 6193-6196; Richter et al., (1994), Tet. Lett. 35 (27), 4705-4706). Brevemente, éster metílico de Boc-4(S)-hidroxiprolina comercialmente disponible se trata con el alcohol arílico o tiol apropiado en presencia de trifenilfosfina y azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y el éster resultante se hidroliza en el ácido.

Esquema VI



Va Vb

Alternativamente, la reacción de Mitsunobu se puede llevar a cabo en fase sólida (Esquema V). El bloque de 96 pocillos del sintetizador Modelo 396 (advanced ChemTech) se provee de partes alícuotas de compuesto (**Va**) unido a resina y se añade una diversidad de alcoholes arílicos o tioles y reactivos apropiados. Después de la incubación, cada producto (**Vb**) unido a resina se lava, seca y segmenta de la resina.

B.2a) Para funcionalizar adicionalmente el sustituyente de arilo se puede utilizar una reacción de Suzuki (Miyaura et al., (1981), Synth. Comm, 11, 513; Sato et al., (1989), Chem. Lett., 1405; Watanabe et al., (1992),

Synlett., 207; Takayuki et al., (1993), J. Org. Chem. 58, 2201; Frenette et al., (1994), Tet. Lett. 35 (49), 9177-9180; Guiles et al., (1996), J. Org. Chem. 61, 5169-5171).

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Otras formas específicas de síntesis o resolución pueden encontrarse en la solicitud en tramitación 09/219.939.

Las temperaturas se dan en grados Celsius. Los porcentajes de las soluciones expresan una relación de peso a volumen, y las relaciones de las soluciones expresan una relación de volumen a volumen, a menos que se indique otra cosa. Los espectros de resonancia nuclear magnética (NMR) fueron registrados en un espectrómetro Bruker de 400 MHz; los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón. La cromatografía de resolución rápida se llevó a cabo sobre gel de sílice (SiO_2) de acuerdo con la técnica de cromatografía de resolución rápida de Still (W.C. Still et al., J. Org. Chem., 1978), 43, 2923).

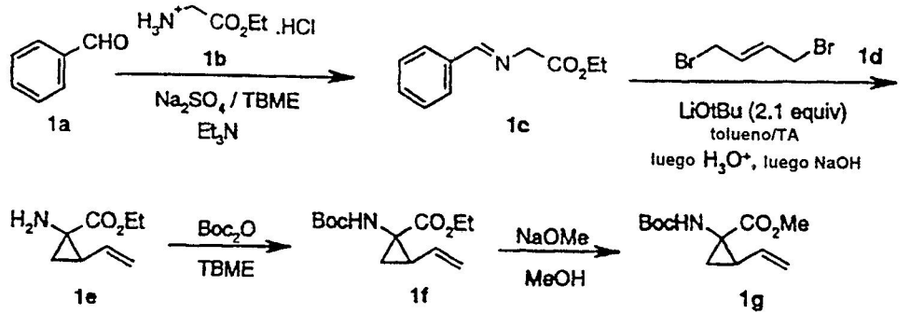
Las abreviaturas usadas en los ejemplos incluyen Bn: bencilo; Boc: terc-butiloxicarbonilo {$Me_3COC(O)$}; BSA: albúmina de suero bovino; CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato; DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]-undec-7-eno; CH_2Cl_2=DCM: cloruro de metileno; DEAD: azodicarboxilato de dietilo; DIAD: azodicarboxilato de diisopropilo; DIPEA: diisopropiletilamina; DMAP: dimetilaminopiridina; DCC: 1,3-diciclohexilcarbodiimida; DME: 1,2-dimetoxietano; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; DTT: ditiotreitol o treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol; DPPA: difenilfosforil-azida; EDTA: ácido etilendiaminatetraacético; Et: etilo; EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etilo; Et_2O: dietil-éter; HPLC: cromatografía de líquidos de alto rendimiento; MS: espectrometría de masas; (MALDI-TOF: Matrix

Assisted Laser Disorption Ionization-Time of Flight (ionización por disorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo), FAB: bombardeo con átomos rápidos); LAH: hidruro de aluminio y litio; Me: metilo; MeOH: metanol; MES: (ácido 2-{N-morfolino}etano-sulfónico); NaHDMS: bis(trimetilsilil)amida sódica; NMM: N-metilmorfolina; NMP: N-metilpirrolidina; Pr: propilo; Succ: 3-carboxipropanoílo; PNA: 4-nitrofenilamino o p-nitroanilida; TBAF: fluoruro de tetra-n-butilamonio; TBTU: tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; TCEP: hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetra-hidrofurano; TIS: triisopropilsilano; TLC: cromatografía en capa fina; TMSE: trimetilsililetilo; Tris/HCl: hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano.

RESTOS P1

EJEMPLO 1

Síntesis de carboxilato de metil(1R,2S)/(1S,2R)-1-amino-2-vinilciclopropilo (1g):



Hidrocloruro de éster glicinetílico **1b** (1519,2 g, 10,88 mol, 1,0 equiv.) se suspendió en terc-butil-metil-éter (8 l). Se añadieron benzaldehído (**1a**) (1155 g, 10,88 mol, 1 equiv.) y sulfato de sodio anhidro (773 g, 5,44 mol, 0,5 equiv.), y la mezcla se enfrió hasta 5° en un baño de hielo-agua. A lo largo de 15 min se añadió gota a gota trietilamina (2275 ml,

16,32 mol, 1,5 equiv.) (uso de 0,5 l de terc-butil-metil-éter para los aclarados) y la mezcla se agitó durante 40 h a TA. La reacción se enfrió después bruscamente mediante la adición de agua enfriada con hielo (5 l) y la capa orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con terc-butil-metil-éter (1 l) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con una mezcla de $NaHCO_3$ saturado (400 ml) y agua (1,6 l) y luego salmuera. La solución se secó sobre $MgSO_4$, se concentró a presión reducida y el aceite amarillo residual se secó hasta un peso constante en vacío. Se obtuvo imina **1c** en forma de un aceite amarillo espeso que solidifica a -20° (2001 g, 96% de rendimiento).

^1H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz) δ 8,30 (s,1H), 7,79 (m, 2H), 7,48-7,39 (m, 3H), 4,40 (d, J = 1,3 Hz, 2H), 4,24 (q, J = 7 Hz, 2H), 1,31 (t, J = 7 Hz, 3H).

Terc-butóxido de litio (4203 g, 52,5 mmol, 2,1 equiv.) se suspendió en tolueno seco (60 ml). Imina **1c** (5,020 g, 26,3 mmol, 1,05 equiv) y dibromuro **1d** (5,348 g, 25 mmol), 1 equiv.) se disolvieron en tolueno seco (30 ml), y esta solución se añadió gota a gota a lo largo de 30 min a la solución agitada de LiOtBu a TA. Después de la compleción, la mezcla roja oscura se agitó durante 10 min adicionales y se enfrió bruscamente mediante la adición de agua (50 ml) y terc-butil-metil-éter (TBME, 50 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo una segunda vez con TBME (50 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se añadió HCl 1 N (60 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. La fase orgánica se separó y se extrajo con agua (40 ml). A continuación, las fases acuosas se reunieron, se saturaron con sal (35 g) y se añadió TBME (50 ml). A continuación, la mezcla agitada se basificó hasta pH 13-14 mediante la adición cuidadosa de NaOH 10 N. La capa orgánica se separó y la fase orgánica se extrajo con TBME (2 x 50 ml). Los extractos orgánicos que contenían amina libre **1e** se reunieron y se añadió dicarbonato de di-terc-butilo

(5,46 g, 25 mmol, 1 equiv.). Después de agitar durante una noche a TA, la TLC mostró algo de amina libre que no había reaccionado. Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (1,09 g, 5 mmol, 0,2 equiv.) adicional, y la mezcla se sometió a reflujo durante 2 h, momento en el que el análisis por TLC indicó una conversión completa de **1e** en el carbamato **1f**. La solución se enfrió hasta TA, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de resolución rápida utilizando EtOAc al 10% y luego al 20%/hexano como eluyente. Se obtuvo **1f** purificado en forma de un aceite amarillo transparente que solidifica lentamente en vacío (4,014 g, 63% de rendimiento).

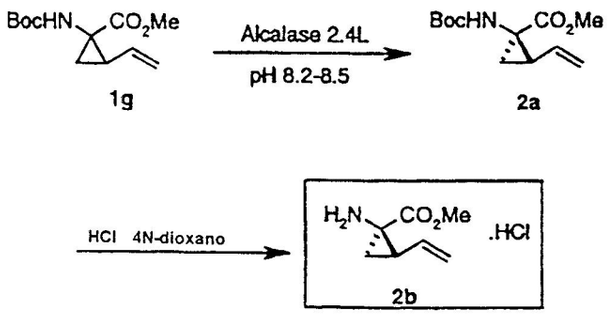
^{1}H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz) δ 5,77 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 17, 1,5 Hz, 1H), 5,18 (s ancho, 1H), 5,11 (dd, J = 10, 1,5 Hz, 1H), 4,29-4,09 (m, 2H), 2,13 (q, J = 8,5 Hz, 1H), 1,79 (m ancho, 1H), 1,46 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,26 (t, J = 7 Hz, 3H).

El éster etílico **1f** (10,807 g, 42,35 mmol) se disolvió en metanol seco (50 mL) y se añadió una solución de metóxido de sodio en MeOH (al 25% p/p, 9,7 mL, 42 mmol, 1 equivalente). La mezcla se calentó a 50° durante 2 h, momento en el que el análisis por TLC indicó una trans-esterificación completa (**1f** Rf 0,38, **1g** Rf 0,34 en EtOAc al 20%/hexano. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA y se acidificó hasta pH 4 utilizando HCl 4 N en dioxano. NaCl precipitado se separó por filtración (uso de terc-butilmetil-éter para los lavados) y los componentes volátiles se separaron a presión reducida. Se añadió terc-butil-metil-éter (100 ml) al residuo y los sólidos se separaron por filtración. La evaporación del filtrado a presión reducica y el secado en vacío dieron éster metílico puro **1g** (10,11 g, 99% de rendimiento).

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz) δ 5,75 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 17, 1 Hz, 1H), 5,18 (s ancho, 1H), 5,11 (ddd, J = 10, 1,5, 0,5 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,14 (q, J = 9 Hz, 1H), 1,79 (m ancho, 1H), 1,50 (m ancho, 1H), 1,46 (s, 9H).

EJEMPLO 2

Resolución enzimática de carboxilato de metil-(1R,2S)/(1S,2R)-1-amino-2-vinilciclopropilo (preparación de 2b a partir de 1g):



El éster racémico **1g** (0,200 g, 0,83 mmol) se disolvió en acetona (3 ml) y se añadió agua (7 ml). Se añadió NaOH 0,05 M (1 gota) para llevar el pH de la solución hasta ~8 y luego se añadió Alcalase® 2,4L (Novo Nordisk Biochem, 0,3 g en un ml de agua). La mezcla se agitó vigorosamente a TA, manteniendo el pH de la solución en 8 utilizando un titulador automático. Al comienzo de los días 4 y 5 de agitación a pH 8, se añadió solución enzimática adicional (2 x 0,3 g). Después de un total de 5 días, se consumió un total de 8,3 mL de NaOH 0,05 M. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAC y agua y la fase orgánica se separó. Después de lavar con salmuera, el extracto orgánico se secó ($MgSO_4$) y concentró en vacío. El compuesto **2a** (0,059 g, 30% de rendimiento) se obtuvo en forma de un aceite transparente.

^{1}H NMR idéntica a la del compuesto **1g**.

HPLC (Chiralcel ODH, 4,6 x 250 mm, EtOH al 1% isocrático en hexano, 0,8 ml/min de caudal): (1R,2S)-**2a** Rt 19,3 min (97%); (1S,2R)-**2a** Rt 17,0 min (3%).

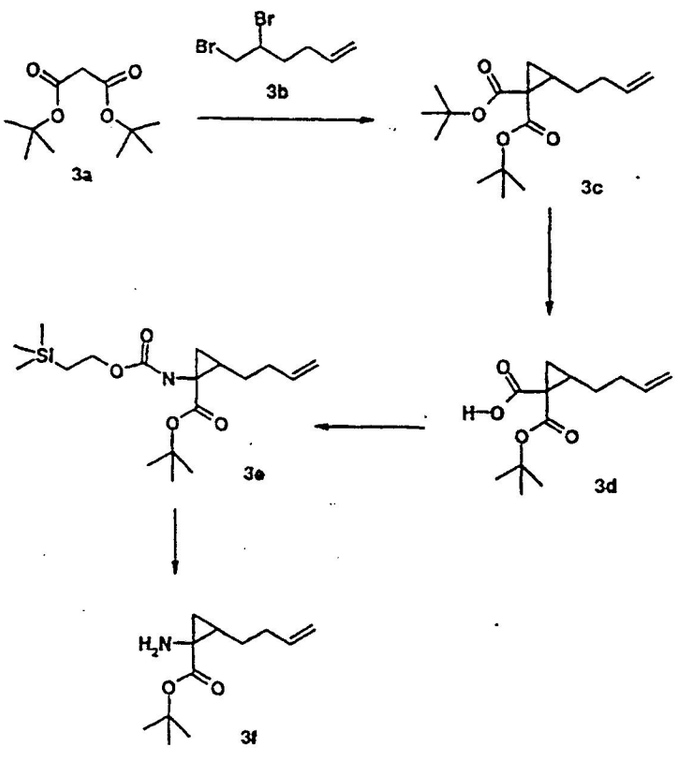
El compuesto **2a** (39,96 g, 165,7 mmol) se disolvió en dioxano (25 ml) y la solución se añadió gota a gota con agitación a HCl 4 N en dioxano (Aldrich, 250 ml). Después de

45 min, el análisis por TLC indicó una desprotección completa. Los componentes volátiles se separaron a presión reducida y el residuo se co-evaporó dos veces con MeOH (2 x 100 ml). Al residuo pardo oleoso se añadieron éter (300 ml) y MeOH (10 ml), y la mezcla se agitó durante una noche a TA dando como resultado la precipitación de un semisólido. Se añadió MeOH adicional (15 ml) y la agitación se continuó durante 6 h, momento en el que se recogió por filtración un sólido amarillento. El producto se lavó con MeOH al 5% en éter (50 ml) y éter (2 x 50 ml), y se secó en vacío para dar al compuesto **2b** en forma de sólido amarillento (22,60 g, 76% de rendimiento). Los filtrados (incluidos los líquidos de lavado) se evaporaron en vacío para dar **2b** adicional en forma de un aceite pardo (7,82 g, 26% de rendimiento). Las dos fracciones eran suficientemente puras para uso en la síntesis de inhibidores de proteasa de HCV:

$[\alpha]^{25}_{D}$ + 38,2° (c 1,0, MeOH). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,15 (s ancho, 3H), 5,65 (ddd, J = 17, 10, 9 Hz, 1H), 5,36 (dd, J = 17, 1,5 Hz, 1H), 5,19 (dd, J = 10, 1,5 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,50 (q, solapamiento con señal DMSO, J = 9 Hz, 1H), 1,86 (dd, J = 10, 6 Hz, 1H), 1,64 (dd, J = 8,6 Hz, 1H).

EJEMPLO 3

Síntesis de carboxilato de t-butil-(1R-2S)/(1S,2R)-1-amino-2-homoalilciclopropilo (3f):



A una suspensión de cloruro de benciltrietilamonio (5,08 g, 22,3 mmol) en NaOH acuoso al 50% (50 ml), se añadieron sucesivamente 1,2-dibromo-5-hexeno (**3b**, 8,10 g, 33,46 mmol) y malonato de di-t-butilo (**3a**, 4,82 g, 22,30 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente a TA durante 16 h, después se diluyó con H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 50 ml). La capa orgánica se lavó adicionalmente con H_2O (2 x 50 ml), salmuera/H_2O (2/1,2 x 50 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna de resolución rápida sobre gel de sílice utilizando EtOAc al 3 a 5% en hexanos como eluyente para obtener el compuesto **3c** con un rendimiento del 38% (2,48 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,19 (bd, J = 7,9 Hz, 2H), 1,25-1,33 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,48 (s, 9H), 1,47-1,60 (m, 1H), 1,75-1,82 (m, 1H), 2,14-2,22 (m, 2H), 4,96 (dm, J = 10,2 Hz, 1H), 5,18 (dm, J = 17,2 Hz, 1H).

ES(+)MS m/z 297 $(M + H)^+$.

A una suspensión de t-butóxido de potasio (5,75 g, 51,25 mmol) en dietiléter anhidro (150 ml) a 0° se añadió H_2O (203 µl, 11,27 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0° durante 10 min. Se añadió una solución etérea del compuesto **3c** (2,48 g en 10 ml de dietiléter, 10,25 mmol), y la mezcla se agitó a TA durante 5 h. La mezcla se diluyó con H_2O enfriada con hielo y se extrajo con dietiléter (3 x 200 ml). La capa acuosa se acidificó hasta pH 3,5-4 con ácido cítrico acuoso al 10% enfriado con hielo y se re-extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). La capa en EtOAc se lavó con H_20 (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó para dar el compuesto **3d** con un rendimiento del 85% basado en la cantidad de material de partida recuperado.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,51 (s, 9H), 1,64-1,68 (m, 1H), 1,68-1,75 (m, 1H), 1,77-1,88 (m, 1H), 1,96-2,01 (m, 1H), 2,03-2,22 (m, 3H), 5,01 (dm, J = 6,4 Hz, 1H), 5,03 (dm, J = 14,9 Hz, 1H), 5,72-5,83 (m, 1H).

ES(+)MS m/z 241 $(M + H)^+$.

A una solución del ácido **3d** en benceno anhidro (1,14 g en 25 ml de benceno, 4,74 mmol), se añadió Et_3N (800 µl, 5,68 mmol), seguido de la adición de difenilfosforilazida (1,13 ml, 5,21 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3,5 h. Subsiguientemente, se añadió trimetilsililetanol (1,36 ml, 9,48 mmol) y se continuó la agitación a reflujo durante 4 h adicionales. Después, la mezcla se enfrió hasta TA, se evaporó hasta la mitad de su volumen original, se diluyó con dietiléter (30 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso al 5% (2 x 30 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y evaporó. El aceite residual se cromatografió sobre gel de sílice utilizando EtOAc al 10% en hexanos como eluyente para obtener el compuesto **3e** puro con un rendimiento del 88% (1,49 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,03 (s, 9H), 0,91-0,99 (m, 2H), 1,18-1,29 (m, 2H), 1,45 (bs, 11H), 1,56-1,72 (m, 2H), 2,02-2,18 (m, 2H), 4,12 (t, J = 8,3 Hz, 2H), 4,93 (dm, J = 10,2 Hz, 1H), 4,98 (dm, J = 17,2 Hz, 1H), 5,07 (bs, 1H), 5,71-5,83

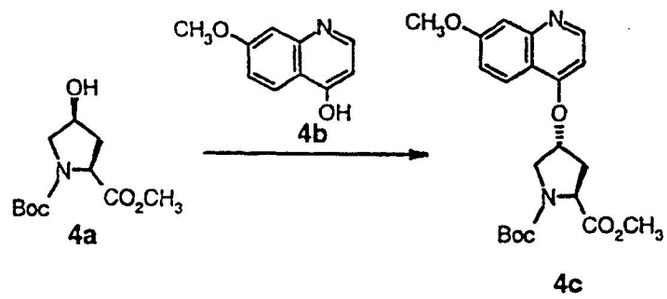
(m, 1H).

A una solución del derivado de ciclopropilo **3e** (1,19 g, 3,35 mmol en 30 ml de THF) se añadió t-Bu_4NF (6,7 ml de 1 M en THF, 6,7 mmol, y la mezcla se agitó primeramente a TA durante 16 h y subsiguientemente se calentó a refujo durante 15 min. El disolvente se evaporó cuidadosamente a baja presión (debido a la elevada volatilidad de la amina libre **3f**, debería tenerse precaución durante la evaporación del disolvente). El residuo bruto se redisolvió en EtOAc (100 ml) y se lavó con H_2O (2 x 50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y de nuevo el disolvente se evaporó cuidadosamente. El producto bruto **3f** se utilizó para el acoplamiento con los derivados de prolina P2 sin purificación adicional.

RESTOS P2

EJEMPLO 4

Síntesis de Boc-4(R)-{(7-metoxi-4-quinolinil)oxi}prolina (4c):



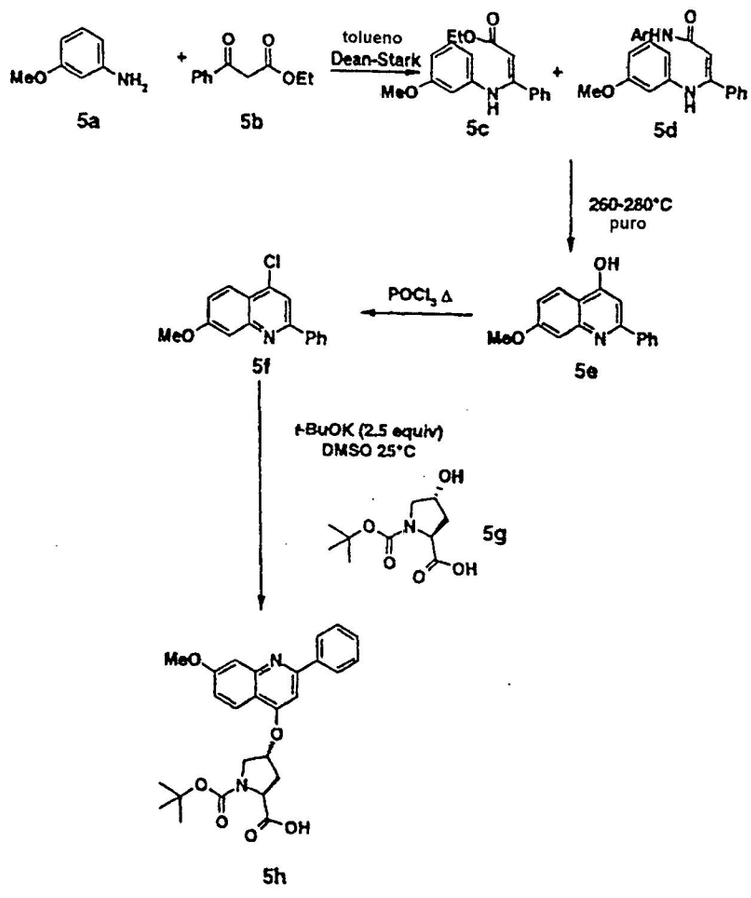
Se preparó 4-hidroxi-7-metoxiquinolina (**4b**) de acuerdo con el método descrito por Chun, M.W.; Olmstead, K.K.; Choi, Y.S.; Lee, C.O.; Lee, C.-K.; Kim, J.H.; Lee, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 789. Una solución de compuesto **4b** (1,88 g, 10,73 mmol) y DEAD (3,4 ml, 21,46 mmol) en THF anhidro se añadió a una solución agitada de cis-hidroxiprolina **4a** (2,63

g, 10,73 mmol) y trifenilfosfina (5,63 g, 21,46 mmol) en THF anhidro (160 ml) a 0° bajo N_2. Se dejó calentar la mezcla de reacción a TA y se agitó durante 14 h. Después, el THF se evaporó y se aisló el producto puro **4c** después de cromatografía en columna de resolución rápida usando MeOH al 5% en EtOAc como eluyente, con un rendimiento del 35% (1,5 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H), 1,65 (bs, 1H), 2,34-2,43 (m, 1H), 2,63-2,76 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,75-3,85 y 3,89-3,99 (2m, 1H, 2 rotámeros), 3,95 (s, 3H), 4,51 y 4,60 (2t, J = 8 Hz, 1H, 2 rotámeros), 5,15 (bs, 1H), 6,53-6,59 (m, 1H), 7,12-7,18 (dd, J = 8,9 y 2,2 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 8,03 (bd, J = 9,2 Hz, 1H), 8,65 (bd, J = 5,1 Hz, 1H).

EJEMPLO 5

Sintesis de Boc-4(R)-{2-fenil-7-metoxi-4-quinolinil)oxi}prolina (5h):



4-hidroxi-7-metoxi-2-fenilquinolina (5e):

Una solución de benzoilacetato de etilo **(5b)** (100.0 g, 0,52 mol), m-anisidina **(5a)** (128,1 g, 1,04 mol) y HCl 4 N/ dioxano (5,2 ml) en tolueno (1,0 l) se sometió a reflujo durante 6,26 h en un aparato de Dean-Stark. La solución en tolueno enfriada se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 10% (2 x 300 ml), NaOH 1 N (2 x 300 ml), H_2O (300 ml) y salmuera (150 ml). La fase en tolueno se secó ($MgSO_4$), filtró y concentró a presión reducida para dar una mezcla 1,2:1,0 de éster **5c** y amida **5d** (144,6 g, 45%/38% de rendimiento bruto) en forma de un aceite pardo oscuro. El aceite bruto se calentó a 280° durante 80 min, al tiempo que la destilación generaba EtOH. El sólido oscuro enfriado obtenido se trituró con CH_2Cl_2 (200 ml). La suspensión se filtró y el sólido

resultante se lavó con CH_2Cl_2 para dar **5e** (22,6 g, 17% de **5a**) en forma de un sólido beige.

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 8,00 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,81-7,82 (m, 2H), 7,57-7,59 (m, 3H), 7,20 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,94 (dd, J = 9,0, 2,2 Hz, 1H), 6,26 (s, 1H), 3,87 (s, 3H).

4-cloro-7-metoxi-2-fenilquinolina **(5f)**:

Una suspensión de **5e** (8,31 g, 33,1 mmol) en $POCl_3$ (90 ml) se calentó a reflujo durante 2 h (se obtuvo una solución transparente tras el calentamiento). La mezcla se reacción se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre NaOH 1 N (exotérmico, NaOH 10 N añadido para mantener un pH elevado) y EtOAc (500 ml). La capa orgánica se lavó con H_2O (100 ml) y salmuera (100 ml), después se secó ($MgSO_4$), filtró y concentró a presión reducida para dar **5f** (8,60 g, 96%) en forma de un sólido amarillo pálido. Esta reacción se repitió tres veces y dio siempre 96-98% de rendimiento que es significativamente mayor que el 68% de rendimiento reseñado en J. Med. Chem. 1997, 40, 1794.

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 8,28-8,30 (m, 2H), 8,20 (s, 1H), 8,10 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,54-7,58 (m, 3H), 7,52 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,38 (dd, J = 9,1, 2,5 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

1-{(1,1-dimetiletoxi)carbonil}-4(R)-{(7-metoxi-2-fenil-4-quinilinil)oxi}-L-prolina **(5h)**:

Terc-butóxido de potasio (8,16 g, 72,7 mmol) se añadió en pequeñas porciones, a lo largo de 15 min, a una solución de **5g** (6,73 g, 29,1 mmol) en DMSO (83 ml) mantenido a 25°. La mezcla se agitó a 25° durante 1,5 h. Se añadió cloroquinolina **5f** (8,61 g, 32,0 mmol) en 4 porciones a lo largo de 15 min a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 25° durante 19 h. La suspensión resultante se vertió en H_2O (650 ml), y la mezcla se lavó con Et_2O (3 x 150 ml) para separar cloroquinolina en exceso (más tarde se encontró que EtOAc era más eficaz). La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N acuoso (38 ml de 1,5 equiv. calculados requeridos, 43,6 ml) hasta pH

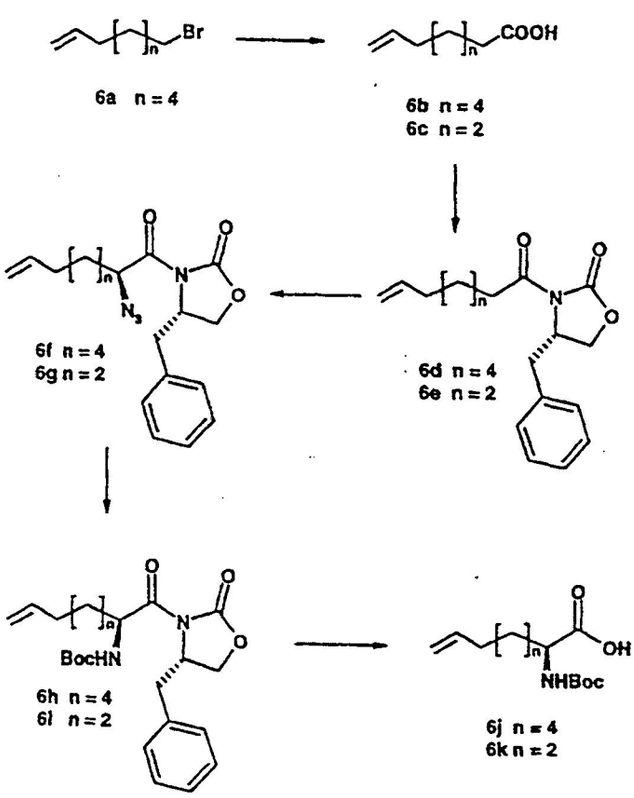
4-5. El sólido blanco que precipitaba se recuperó por filtración. El sólido húmedo se secó a presión reducida sobre P_2O_5 para dar el derivado de prolina **5h** (12,6 g, 91%, contiene 2,3% p/p de DMSO) en forma de un sólido beige.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ (2:1 mezcla de rotámeros) 8,27 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 8,00, 7,98 (2d, J = 9,2, ~9,2 Hz, 1H), 7,48-7,56 (m, 3H), 7,45, 7,43 (2s, 1H), 7,39 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 9,2, 2,5 Hz, 1H), 5,53-5,59 (m, 1H), 4,34-4,41 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,76 (s ancho, 2H), 2,63-2,73 (m, 1H), 2,32-2,43 (m, 1H), 1,36, 133 (2s, 9H).

RESTOS ENLAZADORES DE PEPTIDOS ("D")

EJEMPLO 6

Síntesis de ácidos N-Boc(2S)-2-amino-alquenoicos (6j y 6k):



A una suspensión agitada de tiras de Mg cortadas finamente (0,55 g, 22,5 mmol) en THF seco (30 ml) que contiene dibromoetano (0,1 ml), se añadió gota a gota 8-bromo-1-octeno (**6a**, 2,52 mL, 15 mmol) a lo largo de un periodo de 15 min [la reacción es ligeramente exotérmica]. Después de 30 min, la mezcla se calentó a 38° durante 1 h y después se enfrió a -78° antes de añadirla mediante una cánula sobre una cantidad en exceso de CO_2 sólido. La mezcla se diluyó con dietil-éter (100 ml) y la solución se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. Se obtuvo un aceite bruto que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando EtOAc al 15% en hexanos como eluyente para dar el compuesto **6b** con un 62% de rendimiento (1,44 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,31-1,42 (m, 6H), 1,60-1,69 (m, 2H), 2,02-2,09 (m, 2H), 2,35 (t, J = 8,3 Hz, 2H), 4,99 (dm, J = 10,0 Hz, 1H), 5,04 (dm, J = 17,0 Hz, 1H), 5,75-5,86 (m, 1H).

A una solución vigorosamente agitada del ácido carboxílico **6b** (1,36 g, 8,7 mmol) en THF anhidro (70 ml) a -78° se añadieron Et_3N recién destilado (1,6 ml; 11,3 mmol) y cloruro de pivaloílo (1,18 ml, 9,58 mmol) mediante una jeringa bajo condiciones anhidras. La mezcla se agitó a -78° durante 15 min y después a 0° durante 45 min. La mezcla se enfrió de nuevo a -78° y después se transfirió mediante una cánula a una solución anhidra de sal de litio de 4(S)-4-(fenilmetil)-2-oxazolidinona en THF a -78°; la sal de litio del reactivo de oxazolidinona había sido preparada previamente mediante la adición lenta de n-BuLi (2,00 M en hexanos, 7,85 ml, 15,7 mmol) a una solución en THF (20 ml) de la oxazolidinona (2,78 g, 15,7 mmol) en THF a -78°.

La mezcla de reacción se agitó a -78° durante 15 min y después a TA durante 1,5 h. Finalmente, se enfrió bruscamente con una solución acuosa de bisulfato sódico (100 ml de 1M) y el THF se evaporó a los 3/4 de su volumen inicial. El residuo se extrajo con EtOAc (2 x 150 ml) y las capas orgánicas mezcladas se lavaron con $NaHCO_3$ al 5% (3 x 50 ml) y salmuera

(2 x 50 ml), se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron. El aceite bruto resultante se cromatografió en gel de sílice usando EtOAc al 15% en hexanos para obtener el compuesto **6d** con un 68% de rendimiento (1,88 g).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,35-1,47 (m, 6H), 1,67-1,74 (m, 2H), 2,02-2,09 (m, 2H), 2,65 (dd, J = 13,4 y 9,9 Hz, 1H), 2,84-3,02 (m, 2H), 3,31 (dd, J = 13,4 y 3,2 Hz, 1H), 4,13-4,22 (m, 2H), 4,62-4,71 (m, 1H), 4,93 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 5,00 (dd, J = 17,2 y 1,6 Hz, 1H), 5,75-5,84 (m, 1H), 7,18-7,38 (m, 5H).

El ácido carboxílico **6c** comercialmente disponible se convirtió en el compuesto **6e** siguiendo el mismo protocolo de síntesis que para la preparación del compuesto **6d** a partir de **6b**.

A una solución agitada de KHMDS (THF 0,8 M, 22 ml, 17,5 mmol) en THF seco (50 ml) a -78° se añadió por medio de una cánula una solución del derivado de ácido **6d** ó **6e** (3,25 g, 10,30 mmol) en THF seco (40 mL) a -78°. La mezcla se agitó a -78° durante 45 min. A esta mezcla se añadió una solución de trizilazida (3,67 g, 11,85 mmol) en THF seco (40 ml) a -78°. La mezcla se agitó a -78° durante 3 min y después se enfrió bruscamente con ácido acético (5 ml). Subsiguientemente, se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y 45 min y finalmente a 40° durante 15 min. La mayor parte del THF se evaporó. El residuo se recogió en EtOAc (100 ml) y la solución orgánica se lavó con H_2O (50 ml), $NaHCO_3$ al 5% (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml). Se secó y se evaporó. El aceite obtenido se cromatografió sobre gel de sílice usando hexano/CH_2Cl_2 (1/1) como eluyente para dar el compuesto **6f** ó **6g** (2,47 g, rendimiento 67%).

6f: ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,32-1,45 (m, 6H), 1,45-1,8 (m, 6H), 1,65-1,73 y 1,75-1,88 (2, 2H, rotámeros), 2,01-2,11 (m, 2H), 2,72-3,02 (m, 1H), 3,33 (dd, J = 13,4 y 3,2 Hz, 1H), 4,10-4,28 (m, 2H), 4,62-4,72 (m, 1H), 4,90-5,05 (m, 3H), 5,73-5,88 (m, 1H), 7,17-7,38 (m, 5H).

A una solución agitada de $SnCl_2$ anhidro (2,61 g, 13,8

mmol) en MeOH anhidro (80 ml) se añadió mediante cánula una solución de la azida **6f** ó **6g** (2,45 g, 6,9 mmol) a 0° en MeOH anhidro (20 ml). La mezcla se agitó a TA durante 4 h. El MeOH fue evaporado y el material espumoso obtenido se recogió en dioxano/H_2O (100 µl/20 µl) y se trató con Boc_2O (3,0 g, 13,8 mmol) y $NaHCO_3$ (2,89 g, 34,5 mmol) (el pH se ajustó a 8 con más $NaHCO_3$ si es necesario) y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Parte del dioxano se evaporó (~ 50%) y el residuo se extrajo dos veces con EtOAc. La solución orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó y se evaporó. El residuo obtenido fue cromatografiado sobre gel de sílice usando EtOAc al 20-25% en hexano como eluyente para dar el compuesto **6h** ó **6i** (1,75 g, rendimiento 60%).

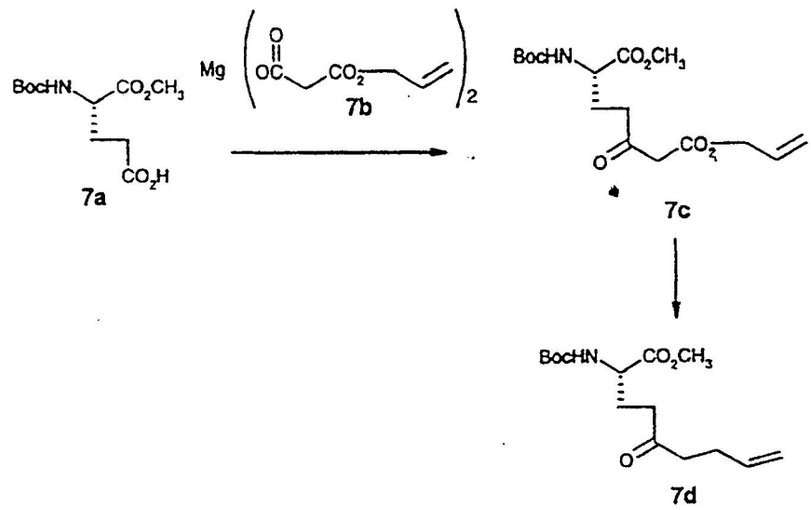
6h: ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,27-1,53 (m, 6H), 1,46 (s, 9H), 1,80 (m, 1H), 2,00-2,08 (m, 1H), 2,80 (t, J = 12,1 Hz, 1H), 3,34 (d, 14,3 Hz, 1H), 4,17-4,23 (m, 2H), 4,60-4,66 (m, 1H), 4,93 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 5,50 (dd, J = 17,2 y 1,9 Hz, 1H), 5,13 (bs, 1H), 5,38-5,43 (m, 1H), 5,74-5,84 (m, 1H), 7,22-7,36 (m, 5H).

A una solución agitada a 90° del derivado n-Boc **6h** ó **6i** (1,74 g, 4,04 mmol) en THF/H_2O (75 µl/15 µl), se añadieron H_2O_2 (30% v/p, 2,05 ml, 16,2 mmol) y $LiOH \cdot H_2O$ (0,34 g, 8,1 mmol) y la solución se agitó a 0° durante 1 h. La reacción se enfrió bruscamente con Na_2SO_3 (2,24 g en H_2O, 15 ml, 17,8 mmol). El pH se ajustó a 4-5 con ácido cítrico acuoso al 10% y la mezcla se diluyó con EtOAc. La fracción acuosa se extrajo una vez más con EtOAc y la solución orgánica se lavó dos veces con salmuera, se secó y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando hexano al 20% en EtOAc como eluyente, para dar el ácido carboxílico libre **6j** ó **6k** (0,76 g, rendimiento 70%).

6j: ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,30-1,42 (m, 7H), 1,62 (s, 9H), 1,60-1,72 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 2,00-2,08 (m, 2H), 4,30 (bs, 1H), 4,94 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 5,00 (dd, J = 17,2 y 1,9 Hz, 1H), 5,73-5,85 (m, 1H).

EJEMPLO 7

Síntesis del éster metílico del ácido N-Boc(2S)-amino-5-oxo-8-nonenoico (7):



A una solución bien agitada del ácido monoalílico de **7b** (1,50 g, 10,4 mmol) en THF seco bajo N_2 (20 ml) a -78° se añadió gota a gota n-Bu_2Mg (0,9M/hexano, 5,8 ml, 5,2 mmol) durante un periodo de 5 min. La suspensión pesada se agitó después a TA durante 1 h y se evaporó (liberación de vacío bajo N_2). La sal sólida de Mg **7b** fue secada bajo vacío durante 1 h.

El compuesto **7a** se mezcló primero con 1,1'-carbonil-diimidazol (1,65 g, 10,21 mmol) en THF anhidro, y la mezcla se agitó a TA durante 1 h para activar el resto ácido libre. Subsiguientemente, el derivado de ácido glutámico activado fue canulado en una solución de la sal de Mg **7b** y la mezcla de reacción obtenida se agitó a TA durante 16 h. Después se diluyó con EtOAc y la solución orgánica fue lavada con HCl 0,5N enfriado en hielo, se trató con salmuera, se secó y se evaporó. El residuo obtenido fue cromatografiado sobre gel de sílice usando EtOAc al 35-40% en hexano como eluyente para dar el compuesto **7c** (1,85 g, rendimiento 53%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,44 (s, 9H), 1,85-1,95 (m, 1H), 2,12-2,22 (m, 1H), 2,58-2,74 (m, 2H), 3,48 (s, 2H), 3,74 (s, 3H), 4,24-4,34 (m, 1H), 4,52 (dm, J = 5,7 Hz, 2H), 5,09 (m, 1H), 5,25 (dm, J = 10,2 Hz, 1H), 5,34 (dm, J = 17,2 Hz, 1H), 5,91 (m, 1H).

A una solución agitada de tetraquis(trifenilfosfina) Pd(0) (0,116 g, 5% en moles, 0,1 mmol) en DMF seca (7 ml) se añadió (mediante una jeringuilla y bajo una atmósfera de N_2) el diéster **7c** (0,687 g, 2 mmol) en DMF seca (3 ml). La mezcla se agitó a TA durante 3,5 h. La DMF se evaporó bajo presión reducida y el residuo se diluyó con EtOAc (20 ml). La solución en EtOAc se lavó con HCl 0,5 N enfriado con hielo (5 ml) y con salmuera (10 ml), se secó y se evaporó. El residuo fue cromatografiado sobre gel de sílice usando EtOAc al 15-20% en hexano como eluyente para dar el compuesto **7d** (0,253 g, rendimiento 42%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,44 (s, 9H), 1,84-1,94 (m, 1H), 2,08-2,22 (m, 1H), 2,33 (dd, J = 14,0 y 7,3 Hz, 2H), 2,45-2,55 (m, 4H), 3,74 (s, 3H), 4,28 (bm, 1H), 4,98 (dm, J = 10,2 Hz, 1H), 5,03 (dm, J = 17,2 Hz, 1H), 5,00-5,10 (m, 1H), 5,74-5,85 (m, 1H).

PEPTIDOS MACROCICLICOS

EJEMPLO 8

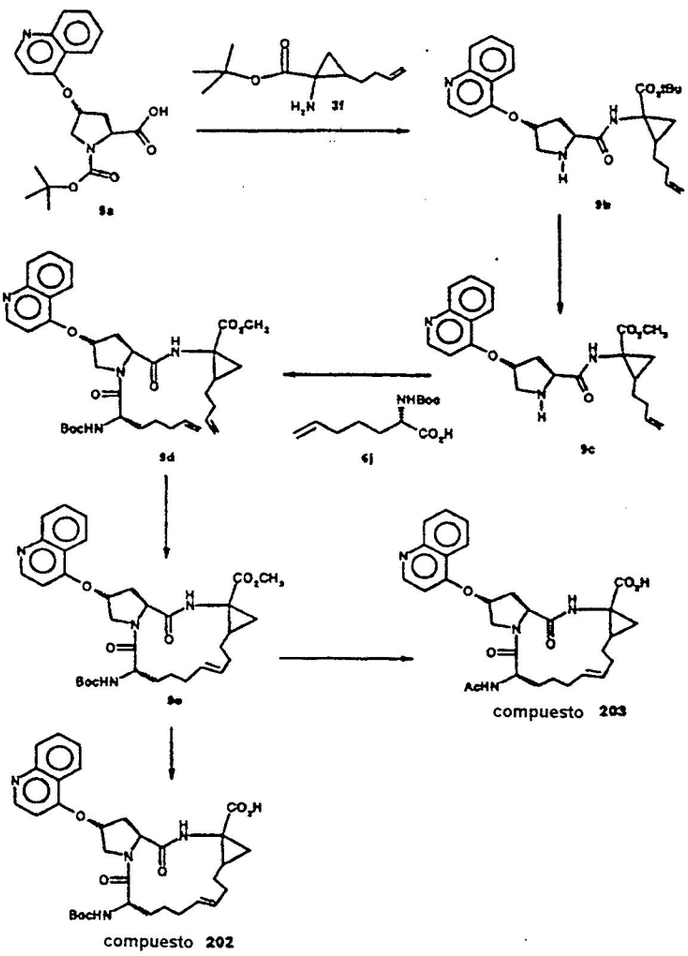
Procedimiento general para reacciones de acoplamiento realizadas en solución {véase también R. Knorr, et al., Tetrahedron Letters, (1989), 30, 1927}

Los reaccionantes, es decir una amina libre (1 eq.) (o su sal hidrocloruro) y el ácido carboxílico libre (1 eq.) se disolvieron en CH_2Cl_2, CH_3CN o DMF. Bajo una atmósfera de nitrógeno se añadieron a la solución agitada cuatro equivalentes de N-metilmorfolina y 1,05 equivalentes del agente de acoplamiento. Después de 20 min, se añadió un equivalente del

segundo reaccionante, es decir ácido carboxílico libre. (Reactivos de acoplamiento prácticos y eficaces para este fin son hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)fosfonio (HOBT) o, preferiblemente, tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) o tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotiazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU). La reacción se vigiló mediante TLC. Después de completarse la reacción, el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc. La solución se lavó sucesivamente con ácido cítrico acuoso al 10%, $NaHCO_3$ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró bajo presión reducida. Cuando el residuo se purificó, esto se hizo por cromatografía de resolución rápida según se definió antes.

EJEMPLO 9

Síntesis de los compuestos 202 y 203 (Tabla 2)



A una solución del derivado de prolina **9a** (1,32 g, 3,68 mmol) y el homoalilo ACCA bruto **3f** obtenida previamente (~ 3,35 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) se añadieron sucesivamente NMM (1,21 ml, 10,05 mmol) y HATU (1,53 g, 4,02 mmol) y la suspensión se agitó a TA durante 18 h. Después de ese periodo, se evaporó el disolvente y la mezcla de reacción bruta se redisolvió en EtOAc (30 ml). La solución se lavó con $NaHCO_3$ acuoso al 5% (2 x 10 ml), salmuera (10 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice utilizando dietiléter al 8% en EtOAc como eluyente para obtener el diastereoisómero deseado del compuesto **9b** en un rendimiento de 20% (no se determinó la estereoquímica absoluta).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,93 y 1,01 (t, J = 8,3 Hz,

rotámeros en la relación de 3:7), 1,14-1,35 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,50-1,82 (m, 4H), 2,08-2,24 (m, 2H), 2,32 (bs, 0,7H), 2,63 (bs, 0,75H), 2,93 (bs, 0,75H), 3,16 (m, 0,25H), 3,77 (bs, 1,5H), 3,88 (bs, 0,5H), 4,4-4,55 (m, 1H), 4,98 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 5,03 (dd, J = 17,2 y 1,6 Hz, 1H), 5,24 (bs, 1H), 5,75-5,88 (m, 1H), 6,57 y 6,78 (2bs, 1H, 2 rotámeros), 7,42-7,58 (m, 3H), 7,63-7,73 (m, 2H), 8,04 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,74 (d, J = 5,1 Hz, 1H).

A una solución del dipéptido **9b** (137 mg, 0,248 mmol) en CH_2Cl_2 seco se añadió una solución de HCl en dioxano (4 M, 4 ml), y la mezcla se agitó a TA durante 1,5 h. A continuación, el disolvente se evaporó y el residuo se secó bajo alto vacío. La mezcla se disolvió en dietiléter/MeOH (3 µl/2 µl) y se trató con un ligero exceso de diazometano disuelto en dietiléter. Después de 30 min, el diazometano en exceso se destruyó con la adición de HCl (4 M en dioxano), y la mezcla se evaporó hasta sequedad para obtener la sal HCl del compuesto **9c** que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

A una suspensión agitada del dipéptido **9c** bruto (0,23 g, 0,48 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml) se añadió sucesivamente el (S)-N-Boc-aminoácido **6j** (0,151 g, 0,62 mmol), NMM (210 µl, 1,91 mmol) y HATU (0,236 g, 0,62 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 16 h (el pH se ajustó a ~ 8 con NNM después de 1 h si era necesario). El CH_2Cl_2 se evaporó, el residuo se recogió en EtOAc (50 ml) y la solución orgánica se lavó con $NaHCO_3$ al 5% (2 x 20 ml), salmuera (2 x 20 ml), se secó y se evaporó. El compuesto bruto obtenido se cromatografió sobre gel de sílice (50 ml, EtOH al 2%/EtOAc) para dar el compuesto **9d** (0,139 g, rendimiento de 46%).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, rotámeros en la relación 6:1) desplazamientos químicos del rotámero principal δ 1,21-1,27 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,45-1,81 (4m, 7H), 2,20-2,22 (m, 4H), 2,28-2,37 (m, 1H), 2,90-2,99 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,94-3,98 (m, 1H), 4,29 (bd, J = 9,9 Hz, 1H), 4,46-4,50 (m, 1H), 4,81

(dd, J = 8,3 y 5,4 Hz, 1H), 4,92-5,06 (m, 4H), 5,16 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,70-5,84 (m, 2H), 6,82 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,47-7,55 (m, 2H), 7,71 (dt, J = 7,0 y 1,3 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,78 (d, J = 5,1 Hz, 1H).

El compuesto de dieno **9d** (0,130 g, 0,205 mmol) se cicló utilizando cantidades catalíticas de dicloruro de bis-(triciclohexilfosfina)bencilideno-rutenio IV (52 mg, 0,064 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml) bajo reflujo durante 2 h para dar, después de la cromatografía sobre gel de sílice (50 ml, EtOH al 3%/ EtOAc), el compuesto **9e** (60,1 mg, rendimiento de 48%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,22-1,30 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 1,44-2,35 (m, 13H), 3,07-3,14 y 3,16-3,24 (2m, 1H, rotámeros en la relación 1:3), 3,69 (s, 3H), 4,42-4,50 (m, 1H), 4,95-5,04 (m, 1H), 5,05-5,15 (m, 1H), 5,20-5,30 (m,1H), 5,55-5,65 (m, 1H), 6,75-6,79 (2d, J = 5,4 Hz, 1H, rotámeros en la relación 1:3), 7,36 (s, 1H), 7,46-7,50 (m, 1H), 8,00 (dd, J = 7,0 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,13 y 8,17 (2d, J = 8,0 Hz, 1H, rotámeros en la relación 1:3), 8,77 (d, J = 5,1 Hz, 1H).

El resto éster del compuesto macrocíclico **9e** (0,0156 g, 0,026 mmol) se hidrolizó con $LiOH \cdot 2\ H_2O$ (8,7 mg, 0,206 mmol) en THF/MeOH/H_2O (4 ml/2 ml/2 ml). El producto bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa C18 en una columna Whatman (Partisil 10,0 DS3) 50/2,4 cm utilizando un gradiente de disolvente de CH_3CN acuoso al 5% a CH_3CN al 100% para obtener el compuesto **202** puro en forma de un sólido blanco amorfo (11,8 g).

^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,12 (s, 9H), 1,20-1,24 (m, 2H), 1,32-1,40 (m, 3H), 1,58-1,62 (m, 2H), 1,68-1,78 (m, 3H), 1,95-2,02 (m, 1H), 2,08-2,18 (m, 2H), 2,42-2,59 (m, 2H), 3,97-3,40 (bd, J = 9,8 Hz, 2H), 4,47 (t, J = 8,6 Hz, 1H), 4,58 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 5,22-5,29 (m, 1H), 5,46-5,54 (m, 1H), 5,66 (s, 1H), 7,12 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 7,68 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 7,98 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,21 (s, 1H), 8,35 (d, J = 8,3 Hz,

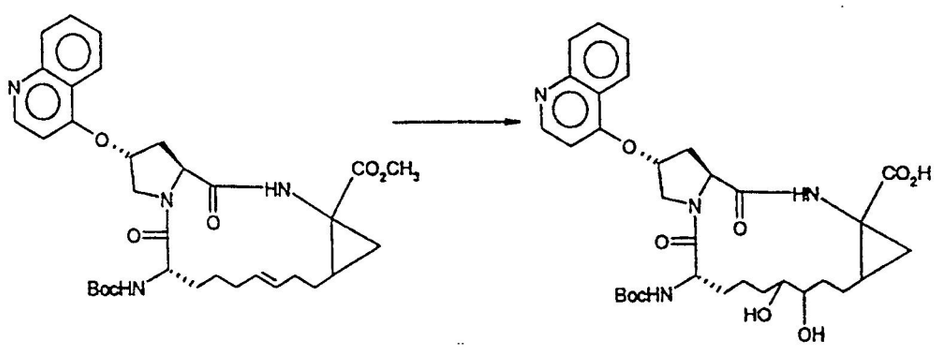
1H), 9,08 (d, J = 5 Hz, 1H).

El compuesto macrocíclico **9e** (20 mg, 0,033 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1 ml) se agitó en presencia de HCl 4M/dioxano (5 ml) durante 1 h. La mezcla se evaporó y se secó cuidadosamente. El residuo se redisolvió en CH_2Cl_2/DMF (3 ml/1 ml) y se trató con NMM (14,5 μl, 0,132 mmol) y anhídrido acético (7,0 μl, 0,073 mmol) y se agitó a TA durante 14 h. La mezcla se evaporó y se secó bajo alto vacío. A continuación, el residuo se disolvió en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (4 ml/2 ml/2 ml) y se agitó durante una noche con LiOH·2 H_2O (11 mg, 0,264 mmol). El residuo, aislado después de la acidificación hasta pH = 3 con HCl 1 N enfriado con hielo, se purificó mediante HPLC de fase inversa C18 utilizando un gradiente de disolvente de CH_3CN acuoso al 0-40% (TFA al 0,06%) con el fin de aislar el compuesto **203** puro en forma de un sólido blanco amorfo (12 mg).

^{1}H NMR (tampón Na_2PO_4 50 mM, pH = 6,0, 600 MHz): δ 1,22-1,27 (m, 2H), 1,38-1,43 (m, 2H), 1,58-1,64 (m, 2H), 1,67-1,76 (m, 2H), 1,77-1,84 (m, 1H), 1,92-1,99 (m, 1H), 2,22-2,08 (m, 1H), 2,12-2,27 (m, 1H), 2,22-2,27 (m, 1H), 2,60-2,67 (m, 1H, Pro-β'), 2,83-2,89 (m, 1H, Pro-β), 4,32 (dd, J = 12,1 y 3,5 Hz, 1H, Pro-δ'), 4,41 (dd, J = 12,1 y 7,3 Hz, 1H), 4,56 (bd, J = 8,0 Hz, 1H, Pro-δ), 4,62 (dd, J = 8,9 Hz, 1H, Pro-α), 5,40-5,46 (m, 1H), 5,55-5,61 (m, 1H), 5,73 (bs, 1H, Pro-γ), 7,41 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 7,64 (bs, 1H, Acca-NH), 7,80 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 8,03 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 7 Hz, 1H, AcNH), 8,36 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,90 (d, J = 6,0 Hz, 1H).

EJEMPLO 10

Síntesis de los compuestos 204 y 205 (Tabla 2)



compuesto **202** compuestos **204/205**

A una solución del compuesto macrocíclico **9e** (21 mg, 0,035 mmol) en t-butanol/H_2O (1,5 ml/1,5 ml) a 0° se añadió una solución de OsO_4 en t-butanol (0,36 ml de una solución al 35% p/v, 0,035 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml) y la solución orgánica se lavó con $NaHCO_3$ al 5% (2 x 10 ml), salmuera (2 x 10 ml), se secó y se evaporó hasta sequedad. El compuesto bruto se recogió en THF/MeOH/H_2O (3 ml/1,5 ml/1,5 ml) y se agitó en presencia de LiOH·2 H_2O (13 mg, 0,028 mmol) durante 16 h. La mezcla se acidificó hasta pH 4 con HCl 0,5 N enfriado con hielo, se evaporó y se purificó mediante HPLC de fase inversa C18 utilizando un gradiente de disolvente de H_2O (TFA al 0,06%) hasta CH_3CN acuoso al 40% (TFA al 0,06%). Los dioles syn **204** y **205** se aislaron con elevada pureza en forma de sólidos blancos amorfos.

204: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,16 (s, 9H), 0,95-1,55 (4m, solapamiento, 10H), 1,56-1,68 (m, 2H), 1,83-1,93 (m, 1H), 2,27-2,38 y 2,45-2,58 (2m, 2H, Pro-2β), 3,15-3,25 (m, 1H), 3,35-3,50 (m, 1H), 3,85 (d, J = 10,0 Hz, 1H, Pro-δ), 4,05 (bs, 1H), 4,42-4,58 (m, 2H, Pro-α y Pro-δ), 5,62 (bs, 1H, Pro-γ), 6,80 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 7,43 (bs, 1H), 7,65-7,75 (m, 1H), 7,92-8,01 (m, 1H), 8,05-8,10 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,59 (s, 1H), 9,06 (d, J = 4,1 Hz, 1H).

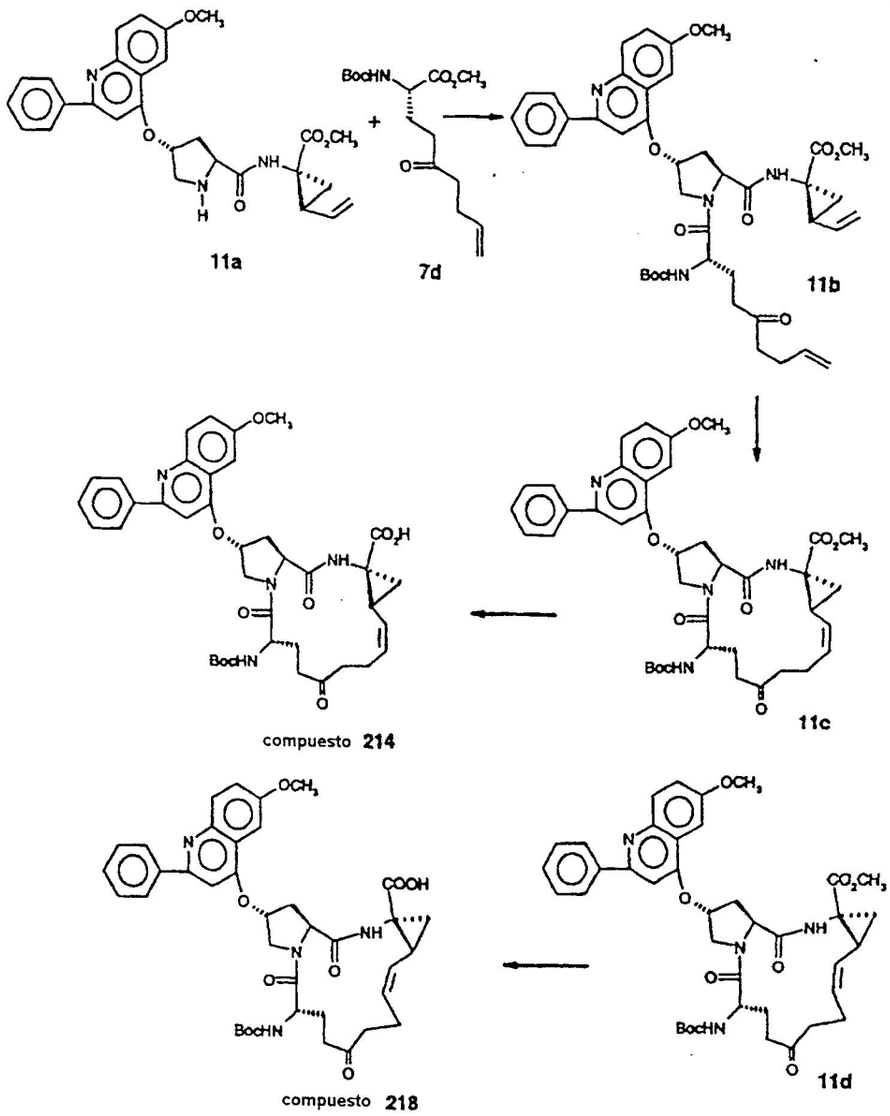
ESMS (modo de ionización negativa): m/z 625 $(M-H)^-$.

~~320~~
314

205: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,01 (s, 9H), 1,06-1,30 (m, 9H), 1,48-1,68 (m, 3H), 1,78-1,88 (m, 1H), ≈ 2,2-2,5 (2m, 2H), 3,78-3,82 (m, 1H), 3,86-3,90 (m, 1H), 4,39 (t, J = 8,9 Hz, 1H), 4,61 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 5,60 (bs, 1H, Pro-γ), 7,03 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 7,40 (bs, 1H), 7,58-7,62 (m, 1H), 7,87-7,91 (m, 1H), 8,00 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,24 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,99 (bs, 1H).
ESMS (modo de ionización negativa): m/z 625 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 11

Síntesis de los compuestos 214 y 218 (Tabla 2)



Una solución del éster de ceto-nonenoato **7d** (0,180 g, 0,6 mmol) en MeOH/H_2O (5 ml/2 ml) se agitó a TA en presencia de LiOH·2 H_2O (50 mg, 1,2 mmol) durante 1 h. La solución se acidificó hasta pH 6 con HCl 0,5 N enfriado con hielo y la mayor parte del MeOH se evaporó. A continuación, el residuo se disolvió en EtOAc (30 ml) y la solución se lavó con HCl 0,5 N enfriado con hielo (10 ml), salmuera (10 ml), se secó y se evaporó. A continuación, el residuo bruto se redisolvió en CH_2Cl_2 (10 ml) y se hizo reaccionar con el fragmento P1-P2 **11a** (0,337 g, 0,6 mmol) en presencia de HATU (233 mg, 0,612

mmol) y DIPEA (420 µl, 2,4 mmol) a lo largo de un periodo de 16 h a TA. La mezcla de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, utilizando EtOAc/hexano (1/1) como eluyente, para aislar el compuesto puro **11b** (0,370 g, rendimiento del 83%, pureza > 95% por HPLC).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,41 (s, 9H), 1,45-1,54 (m, 1H), 1,58-1,62 (m, 1H), 1,73-1,77 (m, 1H), 1,86-1,91 (m, 1H), 2,16 (dd, J = 17,8 y 8,6 Hz, 1H), 2,26-2,43 (2m, 2H), 2,46-2,58 (m, 2H), 2,64-2,81 (m, 1H), 2,85-2,92 y 2,95-3,03 (2m, 1H, rotámeros en la relación 1:3), 3,67 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 4,10-4,18 (m, 1H), 4,20-4,30 (m, 1H), 4,40-4,55 (m, 1H), 4,80-4,88 (m, 1H), 4,92-5,10 (m, 2H), 5,14 (dd, J = 10,2 y 1,6 Hz, 1H), 5,24-5,38 (m, 4H), 5,42-5,54 (m, 1H), 5,68-5,86 (m, 2H), 7,04-7,14 (m, 2H), 7,42-7,64 (m, 5H), 7,92-8,12 (m, 3H).

El dieno **11b** (0,370 g, 0,49 mmol) se cicló en presencia del catalizador de dicloruro de bis-(triciclohexilfosfina)-bencilideno-rutenio IV (0,125 mg, 0,15 mmol) en CH_2Cl_2 (destilado a partir de CaH_2 y desgasificado con argón durante 30 min) a lo largo de un periodo de 2 h a reflujo. El compuesto se obtuvo en forma de una mezcla de estereoisómeros (**11c** y **11d**, relación 1:1) después de la cromatografía en columna de resolución rápida sobre gel de sílice utilizando EtOAc/hexano (3/1) en un rendimiento de 35% (0,124 g).

^{1}H NMR de mezcla de **11c** y **11d** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,44 (s, 4H) y 1,37 (s, 4H), 1,60 (m, 2H), 1,83 (m, 0,5H), 2,01 (m, 1H), 2,09 (m, 1H), 2,42 (m, 5H), 2,73 (m, 2H), 3,26 (m, 0,5H), 3,69 (s, 1,5H), 3,76 (s, 1,5H), 3,96 (s, 3H), 4,10 (m, 1H), 4,24 (m, 0,5H), 4,10 (m, 0,5H), 4,58 (m, 1H), 4,73 (m, 1H), 4,89 (m, 0,5H), 4,97 (m, 0,5H), 5,30 (m, 0,5H), 5,44 (m,2H), 5,64 (m, 1H), 7,1-7,0 (m, 3H), 7,47 (m, 4H), 8,08-7,98 (m, 3H).

La hidrólisis de los ésteres metílicos **11c** y **11d** (24 mg, 0,033 mmol) se llevó a cabo en THF/MeOH/H_2O (1 ml/0,5 ml/0,5 ml) con LiOH·2 H_2O (11 mg, 0,246 mmol) a lo largo de un periodo de 16 h a TA. Después de ese periodo, la mezcla de

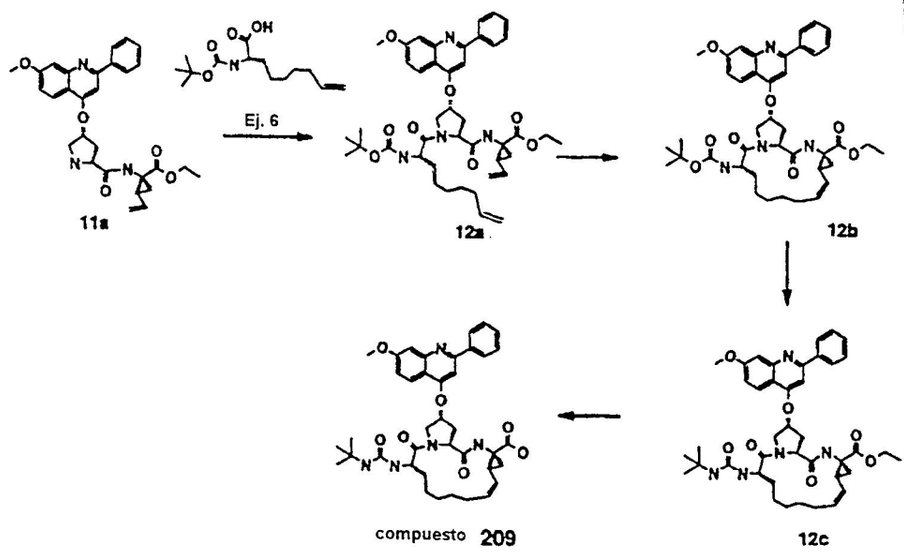
reacción se acidificó a pH 4-5 y se cromatografió sobre una columna de HPLC de fase inversa C18 utilizando un gradiente de disolvente desde H_2O (TFA al 0,06%) hasta CH_3CN acuoso al 50% (TFA al 0,06%). Los compuestos **214** y **218** deseados se aislaron a partir de la mezcla de los dos compuestos con elevada pureza (94% de pureza por HPLC) en un rendimiento del 15% (3 mg).

214: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,15 (s, 9H), 1,48-1,54 (m, 2H), 1,65-1,74 (m, 1H), 1,77-1,85 (m, 1H), 2,12-2,25 (m, 4H), 2,27-2,34 (m, 1H), 2,61-2,68 (m, 1H), 2,87 (bt, J = 11,5 Hz, 1H), 3,92 (dd, J = 9,2 y 1,5 Hz, 1H, Pro-δ), 3,97 (s, 3H, $-OCH_3$), 4,14-4,20 (m, 1H), 4,52 (t, J = 7,8 Hz, 1H, Pro-α), 4,66 (d, J = 11,8 Hz, 1H, Pro-δ), 5,45 (t, J = 9,9 Hz, 1H), 5,51-5,58 (m, 1H), 5,82 (bs, 1H, Pro-γ), 7,09 (d, J = 6,0 Hz, 1H, BocNH), 7,26 (bs, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,67 (bs, 3H), 8,16 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,83 (s, 1H, ACCA-NH).

218: ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,06-1,10 (m, 1H), 1,18 (s, 9H), 1,52-1,55 (m, 1H), 1,62-1,80 (m, 1H), 2,10-2,68 (solapamiento, 9H), 3,90 (bd, J = 8,3 Hz, 1H), 3,96 (s, 3H, OCH_3), 4,20-4,27 (m, 1H), 4,58-4,63 (m, 1H, Pro-δ), 4,66 (dd, J = 8,3 Hz, 1H, Pro-α), 4,88 (dd, J = 10,2 Hz, 1H), 5,18-5,26 (m, 1H), 5,73-5,79 (m, 1H, Pro-γ), 7,01 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 7,23 (bs, 1H), 7,50 (bs, 1H), 7,66 (bs, 3H), 8,20 (bs, 2H), 8,53 (s, 1H).

EJEMPLO 12

Síntesis del compuesto 209 (Tabla 2)



El fragmento P1-P2 **11a** (208 mg, 0,415 mmol) y el enlazador **6** (como en el Ejemplo 6, pero n = 6) (113 mg, 0,415 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml) se dejaron reaccionar a lo largo de un periodo de 16 h a TA en presencia de HATU (189 mg, 0,498 mmol) y DIPEA (252 μl, 1,45 mmol). El CH_2Cl_2 se evaporó, el residuo se recogió en EtOAc (50 ml) y la solución orgánica se lavó con $NaHCO_3$ al 5% (2 x 20 ml), salmuera (2 x 20 ml), se secó y se evaporó. El compuesto bruto obtenido se cromatografió sobre gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de hexanos/EtOAc (7:3 a 1:1) para dar el compuesto **12a** en un rendimiento aislado del 79% (249 mg).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,22 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 1,30-1,50 (m, 7H), 1,41 (s, 9H), 1,56-1,64 (m, 1H), 1,72-1,81 (m, 1H), 1,85-1,91 (m, 1H), 1,98-2,05 (m, 2H), 2,15 (dd, J = 8,5 y 17,4 Hz, 1H), 2,36-2,45 (m, 1H), 2,93-3,02 (m, 1H), 3,91-3,95 (m, 1H), 3,96 (s, 3H, $-OCH_3$), 4,07-4,20 (m, 2H), 4,30 (bd, J = 10,5 Hz, 1H), 4,41-4,48 (m, 1H), 4,82-4,87 (m, 1H), 4,88-5,00 (m, 2H), 5,07-5,15 (m, 2H), 5,27-5,34 (m, 1H), 5,44 (bs, 1H), 5,70-5,80 (m, 2H), 7,05-7,13 (m, 2H), 7,43-7,58 (m, 5H), 8,00-8,09 (m, 3H).

ES(+)MS: m/z 255,3 $(M + H)^+$.

El dieno **12a** (249 mg, 0,330 mmol) se disolvió en 30 ml de CH_2Cl_2 anhidro, y la solución se desgasificó con argón

durante 15 min. El catalizador dicloruro de bis-(triciclohexilfosfina)bencilideno-rutenio IV (82 mg, 0,100 mmol) se disolvió en 3 ml de CH_2Cl_2 anhidro y desgasificado y se añadió a la solución de dieno. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 h bajo N_2. La solución se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución rápida para obtener el compuesto **12b** en forma de un sólido pardo en un 71% de rendimiento (171 mg).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,22-1,44 (m, 10H), 1,42 (s, 9H), 1,66-1,74 (m, 1H), 1,87-1,97 (m, 2H), 2,13-2,28 (m, 3H), 2,32-2,39 (m, 1H), 3,08-3,16 (m,1H), 3,41 (s, 3H), 4,07-4,22 (m, 3H), 4,28-4,34 (m, 1H), 4,58-4,64 (m, 1H), 4,95-4,99 (m, 1H), 5,22-5,29 (m, 2H), 5,38-5,43 (m, 1H), 5,48-5,56 (m, 1H), 7,00-7,12 (m, 3H), 7,43-7,55 (m, 4H), 7,97-8,11 (m, 3H).

ES(+)MS: m/z 727,4 $(M + H)^+$.

El compuesto **12b** (0,117 mmol) se agitó en una solución de HCl (1 ml de 4 N en dioxano) durante 30 min y se concentró hasta sequedad. El sólido se recogió en CH_2Cl_2 (2 ml), y se añadieron sucesivamente Et_3N (82 μl, 0,585 mmol) e isocianato de t-butilo (35 mg, 0,351 mmol). Después de agitar a TA durante 20 h, la mezcla se concentró hasta sequedad y el compuesto bruto **12c** se utilizó en la etapa de hidrólisis final sin purificación adicional.

El compuesto **12c** (85 mg, 0,117 mmol) se disolvió en THF/MeOH/H_2O (2 ml/1 ml/1 ml), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (39 mg, 0,936 mmol)y la solución se agitó durante 20 h a TA. Después de ese periodo se añadió ácido acético (1 ml) y la solución se concentró para separar el MeOH y THF. El compuesto **209** puro se aisló después de la purificación del bruto por HPLC de fase inversa C18 (25 mg, ~ 31% de rendimiento).

^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,04 (s, 9H), 1,15-1,24 (m, 2H), 1,30-1,40 (m, 5H), 1,44-1,51 (m, 2H), 1,54-1,68 (m, 1H), 1,75-1,88 (m,1H), 2,18 (dd, J = 17,2 y 8,5 Hz, 1H), 2,32-2,45 (m, 1H, Pro-β), 2,54-2,62 (m, 1H), 2,65-2,68 (m, 1H, Pro-β), 3,91 (dd, J = 11,1 y 3,5 Hz, 1H, Pro-δ), 3,96 (s, 3H, $-OCH_3$), 4,17-4,23 (m, 1H), 4,47 (dd, J = 8,6 Hz, 1H, Pro-α), 4,67

(bd, J = 7,9 Hz, 1H, Pro-δ), 5,30 (dd, J = 9,5 Hz, 1H), 5,52 (bdd, J = 19 y 8,3 Hz, 1H), 5,68 (s 1H), 5,78 (bs, 1H, Pro-γ), 5,94 (bs, 1H), 7,21 (bs, 1H), 7,51 (bs, 1H), 7,66 (bs, 4H), 8,19 (s, 2H), 8,40 (d, J = 7 Hz, 1H), 8,61 (s, 1H, ACCA-NH).

ES(+)MS: m/z 698,3 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 13

Ensayo de la proteína heterodímera NS3-NS4A de longitud completa

La región no codificadora NS2-NS5B-3' fue clonada mediante RT-PCR en el vector pCR®3 (Invitrogen) usando RNA extraído del suero de un individuo infectado por el HCV genotipo 1b (proporcionado por el Dr. Bernard Willems, Hôpital St-Luc, Montreal, Quebec, Canadá). La región NS3-NS4A (NS3-NS4AFL) fue después subclonada por PCR en el vector de expresión de baculovirus pFastBac® HTa (Gibco/BRL). La secuencia del vector incluye una región que codifica una secuencia N-terminal de 28 restos que contiene una etiqueta de hexahistidina. Se usó el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac® (Gibco/BRL) para producir el baculovirus recombinante. His-NS3-NS4AFL se expresó infectando 10^6 células Sf21/ml con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección de 0,1-0,2 a 27°. Durante la expresión ocurre auténtica autoproteolisis para producir un complejo de proteína NS3-NS4A covalente y estable (denominado de longitud completa "FL"). El cultivo infectado se recolectó 48 a 64 horas después mediante centrifugación a 4°. El sedimento celular fue homogeneizado en $NaPO_4$ 50 mM, pH 7,5, 40% de glicerol (p/v), β-mercaptoetanol 2 mM, en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasa. Después se extrajo la His-NS3-NS4AFL del lisado celular con 1,5% de NP-40, 0,5% de Triton X-100, NaCl 0,5 M y un tratamiento con DNasa. Después de ultracentrifugación, el extracto soluble se diluyó 4 veces y se unió en una

columna quelante de Ni Hi-Trap de Pharmacia. La His-NS3-NS4AFL se eluyó en forma pura en > 90% (según SDS-PAGE), usando un gradiente de imidazol de 50 a 400 mM. La His-NS3-NS4AFL se almacenó a -80° en fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, 10% (p/v) de glicerol, NaCl 0,5 M, imidazol 0,25 M, 0,1% de NP-40. Se descongeló en hielo y se diluyó inmediatamente antes de su uso.

La actividad de proteasa de His-NS3-NS4AFL se ensayó en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, citrato sódico 0,25 M, 0,01% (p/v) de n-dodecil-β-D-maltósido, TCEP 1 mM. Cinco (5) μM del sustrato enfriado de forma brusca internamente antranilil-DDIVPA-bu[C(C)-O]-AMY(3-NO_2)- TW-OH en presencia de diversas concentraciones de inhibidor fueron incubados con 1,5 nM de His-NS3-NS4AFL durante 45 min a 23°. La concentración final de DMSO no sobrepasó 5,25%. La reacción se terminó mediante la adición de MES 1M, pH 5,8. La fluorescencia del producto N-terminal se controló en un fluorómetro Perkin-Elmer LS-50B equipado con un lector de placas de 96 pocillos (longitud de onda de excitación: 325 nm; longitud de onda de emisión: 423 nm).

El % de inhibición se calculó con la ecuación siguiente:

$$100 - [(\text{cuentas}_{inh} - \text{cuentas}_{blanco}) / (\text{cuentas}_{ctl} - \text{cuentas}_{blanco}) \times 100]$$

Se aplicó un ajuste de la curva no lineal con el modelo de Hill a los datos de inhibición-concentración, y se calculó la concentración eficaz al 50% (IC_{50}) usando el *software* SAS (Statistical Software Systems; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

EJEMPLO 14

Ensayos de especificidad

La especificidad de los compuestos se determinó frente a diversas proteasas de serina: elastasa leucocitaria humana, elastasa pancreática bovina y α-quimotripsina pancreática bovina y una proteasa de cisteína: catepsina B hepática humana.

En todos los casos se utilizó un protocolo de formato de placa de 96 pocillos usando un sustrato cromogénico específico para cada enzima. Cada ensayo incluyó 1 h de preincubación de enzima-inhibidor a temperatura ambiente, seguida por la adición de sustrato e hidrólisis a ≈ 30% de conversión, medida en un lector de microplacas UV Thermomax® o un lector de placas Perkin-Elmer® L550B de fluorescencia. Las concentraciones de sustrato se mantuvieron lo más bajas posible en comparación con K_M para reducir la competición del sustrato. Las concentraciones de compuesto variaron de 300 a 0,06 μM, dependiendo de su potencia.

Las condiciones finales para cada ensayo fueron las siguientes:

- Tris-HCl 50 mM pH 8, Na_2SO_4 0,5 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DMSO al 3%, Tween-20 al 0,01% con
- [Succ-AAPF-pNA 100 μM y 250 pM de α-quimotripsina], [Succ-AAA-pNA 133 μM y elastasa porcina 8 nM], [Succ-AAV-pNA 133 μM y elastasa leucocitaria 8 nM]; o
- [$NaHPO_4$ 100 mM pH 6, EDTA 1 mM, DMSO al 3%, TCEP 1 mM, Tween-20 al 0,01%, Z-FR-AMC (7-amino-4-metilcumarina) 4 μM y catepsina B 0,5 nM (la enzima de partida fue activada en tampón que contenía TCEP 20 mM antes de usarla)].

Un ejemplo representativo se resume a continuación para elastasa pancreática porcina:

A una placa de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Cellwells, Corning) se añadió, usando un manipulador de líquidos Biomek (Beckman):

- 40 μL de tampón para ensayo (Tris-HCl 50 mM pH 8, Na_2SO_4 1 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM);
- 20 μL de solución enzimática (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, Tween-20 al 0,02%, elastasa pancreática porcina 40 nM); y
- 20 μL de solución de inhibidor (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, Tween-20 al 0,02%, inhibidor 1,5 mM-0,3μM, 15% v/v DMSO).

Después de 60 min de preincubación a TA, se añadieron a cada pocillo 20 µL de solución de sustrato (Tris-HCl 50 mM pH 8, Na_2SO_4 0,5 M, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, Succ-AAA-pNA 665 µM), y la mezcla de reacción se siguió incubando a TA durante 60 min, al cabo de los cuales se leyó la absorbancia en el lector de placas UV Thermomax®. Filas de pocillos fueron asignadas para testigos o controles (sin inhibidor) y para blancos (sin inhibidor y sin enzima).

Las diluciones dobles secuenciales de la solución de inhibidor fueron realizadas por el manipulador de líquido en una placa separada, usando Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, Tween-20 al 0,02%, 15% DMSO. Todos los demás ensayos de especificidad se realizaron de manera similar.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula:

$$[1-((UV_{inh}-UV_{blanco})/(UV_{ctl}-UV_{blanco}))]x100$$

Se aplicó un ajuste de la curva no lineal con el modelo de Hill a los datos de inhibición-concentración, y se calculó la concentración eficaz al 50% (IC_{50}) usando el *software* SAS (Statistical Software Systems; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.).

EJEMPLO 15

Ensayo de la NS3 proteasa basado en células

Este ensayo se hace con células Huh-7, una línea celular humana derivada de un hepatoma, cotransfectadas con 2 construcciones de DNA:

- una que expresa una poliproteína que comprende las proteínas no estructurales del HCV fusionadas con tTA por el orden siguiente: NS3-NS4A-NS4B-NS5A-tTA (denominada NS3);
- la otra que expresa la proteína reporter, fosfatasa alcalina secretada, bajo el control de tTA (denominada SEAP).

La poliproteína debe ser segmentada por la NS3 proteasa con el fin de que las proteínas maduras sean liberadas. Tras la liberación de las proteínas maduras, se cree que las proteínas virales forman un complejo en la membrana del retículo endoplasmático, mientras que la tTA migrará al núcleo y transactivará el gen de la SEAP. Por consiguiente, la reducción de la actividad proteolítica de NS3 conduce a la reducción de niveles de tTA madura y al concomitante descenso de la actividad de SEAP. Para controlar la toxicidad del compuesto, se efectúa una transfección paralela en la que una construcción que expresa tTA sólo (denominada tTA) se co-transfecta con la construcción de SEAP, de modo que la actividad de SEAP es independiente de la actividad proteolítica de NS3.

Protocolo del ensayo: Células Huh-7, desarrolladas en CHO-SFMII + FCS (suero de ternera fetal) al 10% fueron co-transfectadas con NS3 y SEAP utilizando el protocolo de FuGene (Boehringer Mannheim). Después de 5 h a 37°C, las células se lavaron, se tripsinaron y se pusieron en placa (a razón de 80.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos que contenían una gama de concentraciones de los compuestos a ensayar. Después de un periodo de incubación de 24 h, se midió la actividad de SEAP en el medio con el kit Phospha-Light (Tropix).

El análisis del porcentaje de inhibición de la actividad de SEAP con respecto a la concentración de compuesto se realizó con el *software* SAS para obtener el valor de EC_{50}.

EJEMPLO 16

Tablas de compuestos

Las tablas que siguen recogen compuestos representativos de la invención.

Se encontró que todos los compuestos expuestos en las Tablas 1 a 4 eran activos en el ensayo presentado en el Ejemplo 13 con una IC_{50} inferior a 50 μM.

Se encontró que el compuesto **202** no inhibía los ensayos de especificidad presentados en el Ejemplo 14. Los resultados de los diferentes ensayos de especificidad son los siguientes: HLE > 300 μM; PPE > 300 μM; α-quim. > 300 μM; Cat. B > 300 μM; indicando que estos compuestos son específicos hacia la NS3 proteasa del VHC y no provocarán efectos secundarios mínimos cuando se inyecten a mamíferos infectados.

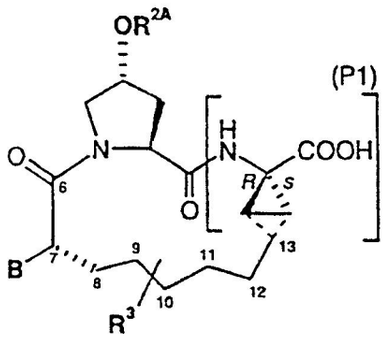
Estos resultados indican que esta familia de compuestos es muy específica para la proteasa NS3.

Además, se ensayaron varios de estos compuestos en el ensayo basado en células descrito en el Ejemplo 15, y se encontró que tenían actividad con una EC_{50} inferior a 1 μM, indicando intensamente que estos compuestos pueden atravesar la membrana celular, están biodisponibles y son eficaces in vivo.

Las abreviaturas siguientes se usan en la presente descripción:

MS: datos espectrales de masas; Ac; acetilo; ACCA: ácido 1-aminociclopropilcarboxílico; Bn: bencilo; Boc: terc-butiloxicarbonilo; Ph: fenilo; tBu: terc-butilo.

TABLA 1



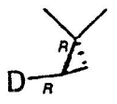
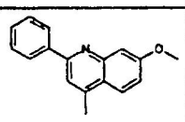
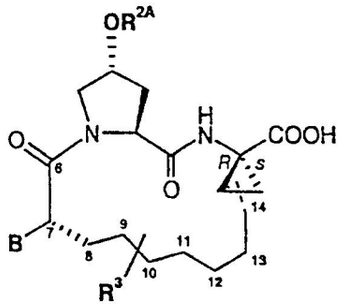
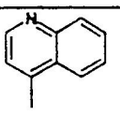
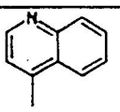
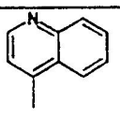
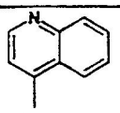
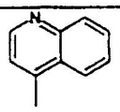
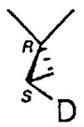
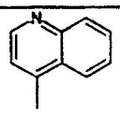
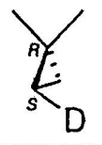
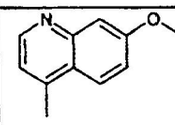
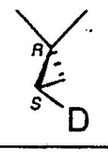
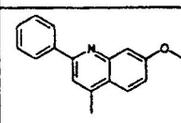
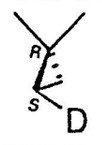
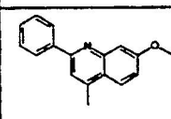
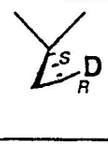
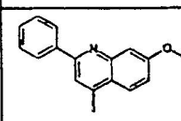
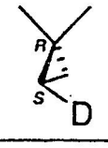
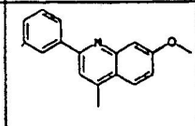
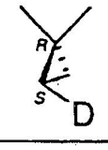
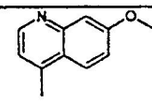
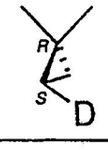
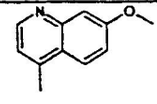
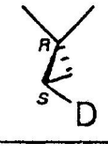
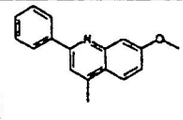
Comp. nº	B	R^3	doble enlace	P1	R^{2A}	MS m/z (M+H)+
101	N-Boc	–	12,13-trans			685.8

TABLA 2



estereoisómero simple en el ciclopropano

Comp. nº	B	R³	doble enlace	P1 estereoquímica	R2A	MS m/z (M+H)⁺
201	N-Boc	–	10,11-*trans*	?		593.7
202	N-Boc	–	10,11-*trans*			593.7
203	N-acetyl		10,11-*trans*			535.6
204	N-Boc	10-OH, 11-OH syn (un isómero)	–	?		627.7
205	N-Boc	10-OH, 11-OH syn (otro isómero)	–	?		627.7
206	N-Boc	–	11,12-*cis*			593.7

Comp. nº	B	R^3	doble enlace	P1 estereoquímica	R^{2A}	MS m/z (M+H)⁺
207	N-Boc	–	12,13-*cis*			623.7
208	N-Boc	–	12,13-*cis*			699.8
209	NC(O)-NtBu	–	12,13-*cis*			698.8
210	N-Boc	–	12,13-*cis*			699.8
211	NH_2	–	13,14-*cis*			599.7
212	OH un isómero	–	13,14-*cis*			524.6
213	OH otro isómero	–	13,14-*cis*			524.6
214	N-Boc	10-oxo	13,14-*cis*			713.8

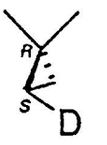
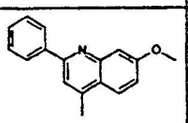
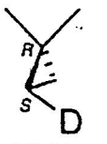
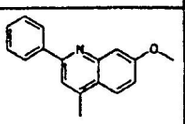
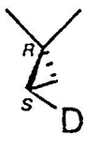
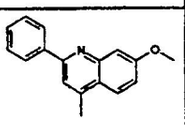
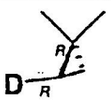
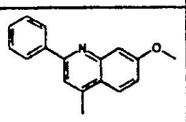
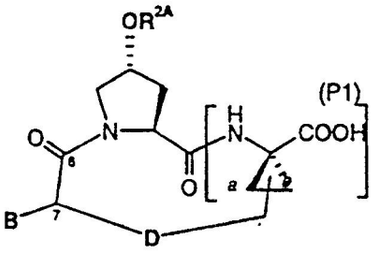
Comp. nº	B	R^1	doble enlace	P1 estereoquímica	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
215	N-Boc	–	ninguno			701.8
216	N-Boc	10-OH	13,14-*cis*			715.8
217	N-Boc	10-OH	13,14-*cis*			715.8
218	N-Boc	10-oxo	13,14-*cis*			713.8

TABLA 3



estereoisómero simple en el ciclopropano

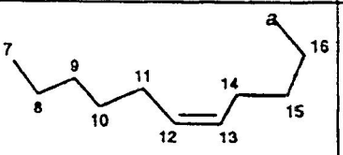
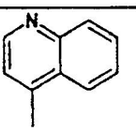
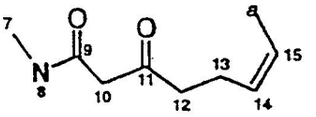
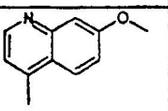
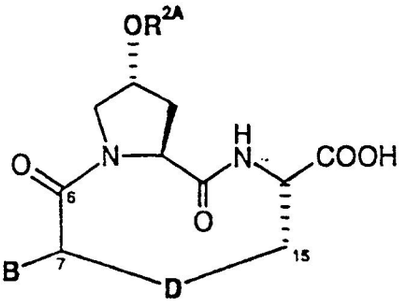
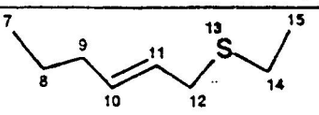
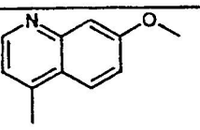
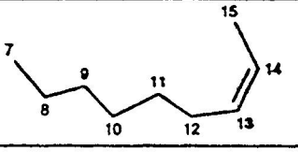
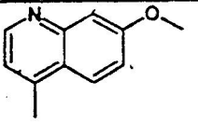
Comp. nº	B	- D -	P1	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
301	N-Boc		a o b syn resp. al ácido		621.7
302			a o b syn resp. al ácido		581.6

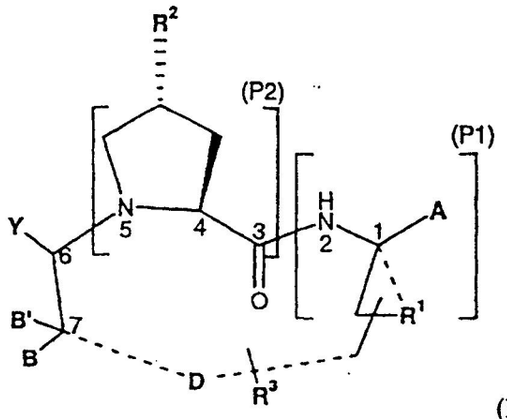
TABLA 4



Comp. nº	B	- D -	R^{2A}	MS m/z= $(M+H)^+$
401	Boc			629.7
402	Boc			611.7

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1.- Un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que

R^1 es H, CHO, CH_2OH, tiol; o un alquileno C_{1-3}, opcionalmente enlazado al átomo de carbono número 1 para formar un sistema "espiro"-cíclico; y

R^2 es R^{2A}; OR^{2A}, SR^{2A}, NHR^{2A} o $NR^{2A}R^{2B}$, en donde R^{2A} y R^{2B} son, independientemente:

alquilo C_{1-16}, alquenilo C_{2-16}, cicloalquilo C_{3-16} saturado o insaturado, estando dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido con NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalquilo o carboxilo; conteniendo dicho alquilo, alquenilo o cicloalquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N; o R^{2A} y R^{2B} se seleccionan independientemente de un primer arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}, estando dicho primer arilo o aralquilo opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-7}, NH_2, $NHC(O)CH_3$, NO_2, OH, SH, halo, haloalquilo, alcoxi C_{1-6}, carboxilo, ácido (alquil)inferior-carboxílico o un segundo arilo o aralquilo; conteniendo dicho primero y

segundo arilo o aralquilo opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

estando dicho cicloalquilo, arilo o aralquilo, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un segundo anillo de 5, 6 ó 7 miembros para formar un sistema cíclico o heterociclo, estando dicho segundo anillo opcionalmente sustituido con NH_2, acetamino, nitro, OH, SH, halo, haloalquilo, carboxilo o ácido (alquil)inferior-carboxílico; conteniendo dicho segundo anillo, opcionalmente, al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en: O, S y N;

Y es H, carbonilo, tiocarbonilo, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, alcoxi C_{1-6}, arilo $C_{6\ 6\ 10}$ o aralquilo C_{7-16};

B es H, hidroxilo, amino, amida, carbonilo, tiol, alquilo, arilo, o **B** es una cadena de alquilo que contiene un heteroátomo, saturada o insaturada, enlazada a **D** para formar un heterociclo;

B' es H, OH, NH_2, SH o un amino sustituido.

D es una cadena de alquileno C_{5-10}, saturada o insaturada, que contiene opcionalmente uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de: O, S o N;

R^3 es H o de uno a cinco sustituyentes independientemente seleccionados de hidroxilo, halo, amino, amida, carbonilo, tiol, alquilo C_{1-6}, alcoxi C_{1-6}, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_{7-16}; y

A es un ácido carboxílico o una amida N-sustituida;

o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.